

REINIGUNG VON IgG  
UND IgG-ANTIKÖRPERN  
AUS DEM EIDOTTER  
UND BESTIMMUNG  
DER TEMPERATURRESISTENZ  
UND SÄURETENAZITÄT  
DIESER IMMUNPROTEINE

Ludwig Jürgens

Disbui. München

1987







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554617\\_0078](https://archive.org/details/IA41554617_0078)

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

**REINIGUNG VON IgG UND IgG-ANTIKÖRPERN AUS DEM EIDOTTER**

**UND**

**BESTIMMUNG DER TEMPERATURRESISTENZ UND SÄURETENAZITÄT**

**DIESER IMMUNPROTEINE**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Ludwig Jürgens  
aus  
Hürth-Hermülheim  
München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH  
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

meinen Eltern  
und Martina

" Writing a book is an adventure. To begin with, it is a toy and amusement. Then it becomes a mistress, then it becomes a master, then it becomes a tyrant. The last phase is that just as you are about to be reconciled to your servitude, you kill the monster and fling him about to the public."

Sir Winston Churchill



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                              | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung und Literatur                                                                                  | 1     |
| 1.1 Einleitung                                                                                               | 1     |
| 1.2 Literatur                                                                                                | 3     |
| 1.2.1 Inhaltsstoffe des Eidotters                                                                            | 3     |
| 1.2.1.1 Hühner-IgG                                                                                           | 5     |
| 1.2.1.1.1 Physiologische Daten                                                                               | 5     |
| 1.2.1.2 Immunglobuline im Ei                                                                                 | 8     |
| 1.2.2 Methoden zur Reinigung von Dotter-IgG<br>in der Literatur                                              | 8     |
| 1.2.2.1 Extraktion der Dotterfette mit<br>lipophilen Lösungsmitteln                                          | 9     |
| 1.2.2.2 Gewinnung von Dotter-IgG durch<br>Salzpräzipitation und/oder<br>Ultrazentrifugation                  | 10    |
| 1.2.2.3 Extraktion der Dotterfette mit<br>Dextransulfat und anschließender<br>Konzentrierung mit Neutralsalz | 10    |
| 1.2.2.4 Gewinnung von Dotter-IgG durch<br>Polyäthylenglykol                                                  | 11    |
| 1.2.3 Anwendungsgebiete der Dotter-<br>Immunglobuline                                                        | 11    |
| 1.2.3.1 Anwendung des Dotters für<br>diagnostische Zwecke                                                    | 12    |
| 1.2.3.1.1 zum Nachweis von Viren und<br>Mykoplasmen                                                          | 12    |
| 1.2.3.1.2 zum Nachweis von Proteinen                                                                         | 13    |

|           | Seite                                                                        |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2.3.1.3 | zum Nachweis von Echinokokose 14                                             |
| 1.2.3.1.4 | zum Nachweis von Immunglobulinen 14                                          |
| 1.2.3.1.5 | zum Nachweis von Hormonen und Gewebshormonen 14                              |
| 1.2.3.1.6 | zum Nachweis von Enzymen 15                                                  |
| 1.2.3.1.7 | zum Nachweis von Rezeptoren 15                                               |
| 1.2.3.2   | Einsatz zu therapeutischen Zwecken 16                                        |
| 1.3       | Fragestellung 17                                                             |
| 2.        | Material und Methoden 18                                                     |
| 2.1       | Tiermaterial 18                                                              |
| 2.1.1     | Tiere und Haltung 18                                                         |
| 2.1.2     | Antigen und Immunisierung 18                                                 |
| 2.1.3     | Serumgewinnung 18                                                            |
| 2.1.4     | Eiergewinnung 19                                                             |
| 2.2       | Standardherstellung und Eichung 19                                           |
| 2.2.1     | Puffer und Lösungen 21                                                       |
| 2.3       | Qualitative Methoden 27                                                      |
| 2.3.1     | Ouchterlony (1962) 27                                                        |
| 2.3.2     | Zweidimensionale Immunelektrophorese (Laurell, 1965) 27                      |
| 2.3.3     | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page, Laemmli, 1970), modifiziert 29 |
| 2.4       | Quantitative Methoden 31                                                     |
| 2.4.1     | Proteinbestimmung 31                                                         |
| 2.4.1.1   | nach Bradford (1976) 31                                                      |

|         | Seite                                                                                 |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.4.1.2 | nach Lowry (1951), modifiziert 33                                                     |
| 2.4.2   | Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966) 33                                         |
| 2.4.3   | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, Engvall and Perlmann, 1972), modifiziert 35 |
| 2.5     | Isolierung und Reinigung der Immunglobuline 37                                        |
| 2.5.1   | Dextransulfat-Fällung (Jensenius et al., 1981) 37                                     |
| 2.5.2   | Fällung mit Polyäthylenglykol (PEG) (Polson et al., 1985) 40                          |
| 2.5.3   | Dotterentfettung mit Propanol/Aceton (Bade und Stegemann, 1984) 42                    |
| 2.5.4   | Affinitätschromatographie 44                                                          |
| 2.6     | Hitzestabilitätstest 45                                                               |
| 2.6.1   | Ei 45                                                                                 |
| 2.6.2   | Dotter 46                                                                             |
| 2.7     | Salzsäuretenazität des Dottters 47                                                    |
| 3.      | Ergebnisse 48                                                                         |
| 3.1     | Extraktionsverfahren 48                                                               |
| 3.1.1   | Fettfällung mit Dextransulfat und Kombinationen 48                                    |
| 3.1.2   | Entfettung des Dottters mit Propanol/Aceton und Kombinationen 50                      |
| 3.1.3   | Reinigung des Dotter-IgG mit Polyäthylenglykol 51                                     |

|       | Seite                                                                                                                                                                     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.2   | Vergleich der IgG- und Antikörper-<br>konzentration in Dotter und Serum 56                                                                                                |
| 3.3   | Salzsäuretenazität des Dotter-IgG 59                                                                                                                                      |
| 3.4   | Hitzeresistenz des Dotter-IgG 62                                                                                                                                          |
| 3.4.1 | Hitzeresistenz des Dotter-IgG im<br>gekochten Ei 62                                                                                                                       |
| 3.4.2 | Hitzeresistenz des Dotter-IgG im<br>verdünnten Dotter 65                                                                                                                  |
| 3.5   | Tabellarischer Anhang der<br>Ergebnisse 67                                                                                                                                |
| 4.    | Diskussion 73                                                                                                                                                             |
| 4.1   | Vergleichende Betrachtung der IgG-<br>Reinigungsverfahren 73                                                                                                              |
| 4.1.1 | Vergleich der Fettfällung mit<br>Dextransulfat und der Entfettung<br>mit Propanol/Aceton 74                                                                               |
| 4.1.2 | Vergleich der Kombination der<br>Fettfällung mit Dextransulfat bzw.<br>der Entfettung mit Propanol/Aceton<br>mit der Reinigung und Konzentrierung<br>mit Natriumsulfat 74 |
| 4.1.3 | Kombination der Fettfällung mit<br>Dextransulfat bzw. der Entfettung<br>mit Propanol/Aceton mit affinitäts-<br>chromatographischen Säulenläufen 76                        |

|       |                                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.4 | Vergleich der Methodenkombination<br>aus Entfettung mit Dextransulfat und<br>anschließender Reinigung und Konzen-<br>trierung mit Natriumsulfat mit der<br>Reinigung und Konzentrierung mit<br>Polyäthylenglykol | 77 |
| 4.2   | Vergleich der Serum- und Dotter-<br>Konzentrationen von IgG und<br>Antikörpern                                                                                                                                   | 81 |
| 4.3   | Salzsäuretenazität des Dotter-IgG                                                                                                                                                                                | 82 |
| 4.4   | Hitzestabilität des Dotter-IgG                                                                                                                                                                                   | 83 |
| 4.5   | Überlegungen zur praktischen<br>Anwendung dieser Ergebnisse                                                                                                                                                      | 85 |
| 5.    | Zusammenfassung                                                                                                                                                                                                  | 89 |
| 6.    | Summary                                                                                                                                                                                                          | 91 |
| 7.    | Literaturnachweis                                                                                                                                                                                                | 93 |





## 1. Einleitung und Literatur

### 1.1 Einleitung

Schon 1893 berichtete Dr. Felix Klemperer über " Die Immunität des Huhnes gegen Tetanusbacillen und ihre Uebertragung durch das Eigelb." Aber erst seit 1980, fast neunzig Jahre später, werden immer häufiger Antikörper aus den Dottern von Hühnereiern gewonnen und zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Die Gründe für diese Entwicklung sind vielseitig.

#### - Haltung

Im Gegensatz zur Zeit um die Jahrhundertwende sind heute Hühner in größeren Beständen leicht und vergleichsweise problemlos zu halten; sie sind bei Bedarf auch in großer Stückzahl schnell verfügbar.

#### - Immunisierbarkeit

Hühner sind gut zu immunisieren und reagieren in der Regel mit hohen Antikörpertitern. Außerdem bilden sie, bedingt durch die phylogenetische Distanz zu den Säugetieren, gegen Säugerproteine oft auch dann Antikörper, wenn die üblichen Serumtiere (Pferd, Ziege, Hund, Kaninchen, Ratte) keine oder nur geringe Reaktionen zeigen.

#### - Gewinnung der Antikörper

Es ist weniger aufwendig Eier einzusammeln, als Tieren Blut abzunehmen.

- Tierschutz

Den Hühnern wird bei der Antikörpergewinnung weder Schmerz zugefügt, noch werden die Tiere dadurch geschwächt. Man nutzt vielmehr den physiologischen, züchterisch gesteigerten Eierlegetrieb aus - bei guten Legelinien werden mehr als 260 Eier pro Jahr gelegt - um große Mengen Antikörper zu erhalten. Dadurch können viele Serumtiere eingespart werden, die, wie bisher üblich, die regelmäßigen kleinen oder die einmalige große Blutabnahme über sich ergehen lassen müssen.

Allerdings weisen die Dotterantikörper einen Nachteil auf: sie liegen mit Lipiden und einer Vielzahl von anderen Proteinen in der zähflüssigen Dottermasse eingebettet, die es nötig macht, den Dotter vor dem Antikörperereinsatz zu behandeln.

Die Art der Behandlung hängt vom jeweiligen diagnostischen Nachweisverfahren ab und reicht vom Verdünnen mit einem Puffer, über die Fettextraktion mit lipophilen Lösungsmitteln, über das Auftrennen der einzelnen Fraktionen in der Ultrazentrifuge bis hin zum Isolieren und Konzentrieren des IgG durch Polyäthylenglykol (PEG) oder durch geeignete säulenchromatografische Auftrennungen.

Neben den diagnostischen Anwendungen wird auch an den Einsatz des Dotters für Prophylaxe und Therapie gedacht (Bartz et al., 1980; Lösch et al., 1986). Besonders der orale Einsatz bietet sich an, da Eidotter schmackhaft ist und unbehandelt appliziert werden kann. In diesem Zusammenhang interessiert die Säuretenazität der Dotterantikörper, die die Säurebarriere des Magens überwinden müssen.

Sollen diese Antikörper auch beim Menschen eingesetzt werden, so ist zusätzlich ihre Hitzestabilität von Interesse, da das Ei hier meist in zubereiteter Form Verwendung findet.

## 1.2 Literatur

### 1.2.1 Inhaltsstoffe des Eidotters

Der verdünnte Dotter kann durch Zentrifugation bei niedrigen Umdrehungszahlen und anschließende Ultrazentrifugation in drei Fraktionen unterteilt werden (Freemmann, 1984):

#### Granulasedimentfraktion

Die Fraktion enthält Phosvitin, Lipovitellin und ca. 5% triglyceridreiche Lipoproteine.

Phosvitin ist das am häufigsten vorkommende Phosphorprotein des Dotters (Mecham and Olcott, 1949); 55% seiner Aminosäuresequenz bestehen aus Serinresten, von denen 90 bis 95% phosphoryliert sind (Rosenstein and Taborsky, 1970). Es enthält dadurch 80% des proteingebundenen Dotterphosphors, macht aber nur 10% des Dotterproteins aus. Es bindet eine Reihe von Metallionen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  (Grizzuti and Perlmann, 1973, 1975).

Lipovitellin besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipovitellin, die sich in ihrem Phosphatgehalt (0,5% und 0,27%) unterscheiden.

Die Lipoproteine sind denen der Low-density Fraktion ähnlich aufgebaut (Cornall and Kuksis, 1971 a/b). Bisher sind sie aber noch nicht alle im Detail charakterisiert (Griffin et al., 1984)

#### Low-density Fraktion

Die triglyceridreichen Lipoproteine der Low-density Fraktion enthalten 65% der Dottertrockenmasse und 95% der Dotterlipide. Ihre Struktur entspricht den VLD(very-low-density)-Lipoproteinen des menschlichen Plasmas, und sie werden wie diese durch Phospholipide, Cholesterin und Apoproteine stabilisiert.

#### Fraktion der wasserlöslichen Dotterproteine

Von den ursprünglich als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Livetin bezeichneten Proteinen (Martin et al., 1957), erwies sich  $\alpha$ -Livetin als Serumalbumin (Williams, 1962; McIndoe and Culbert, 1979),  $\beta$ -Livetin als ein  $\alpha_2$ -Glycoprotein (Williams, 1962) und  $\gamma$ -Livetin als  $\gamma$ -Globulin, welches als Hauptkomponente IgG und bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern der UM-B19 Linie auch IgA enthält (Lösch et al., 1986). Weiter wurden noch  $\delta$ -Livetin und ein Apoprotein II gefunden (Burley and Vadehra, 1979). Des weiteren wurden Transportproteine für Biotin, Riboflavin, Thiamin, Vitamin A and Cholecalciferol gefunden und Transferrin, welches zwei Eisenmoleküle bindet. Das meiste Eisen wird jedoch durch Vitillogenin in den Dotter transportiert (Greengard et al., 1964; Morgan, 1975).

Über die genannten Substanzen hinaus sind noch andere Elektrolyte ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{PO}_4^{4-}$ ,  $\text{S}^{2+}$ ), Pigmente (Karotine, Cryptoxanthin, Lutein) und weitere Vitamine ( $\text{B}_{12}$ , E,  $\text{K}_1$ , Folsäure, Nicotinamid, Pantothensäure) im Dotter zu finden (Freemann, 1984).

#### 1.2.1.1 Hühner-IgG

Von den Inhaltsstoffen des Eies war für die Untersuchungen lediglich das Dotter-IgG von Interesse, da nur dieses Immunglobulin in so hoher Konzentration vorliegt, daß eine Isolierung oder anderweitige Anwendung arbeitstechnisch interessant ist.

##### 1.2.1.1.1 Physiologische Daten

Die Grundstruktur des IgG-Moleküls wird von zwei Typen von Polypeptidketten bestimmt. Die kleinere L-Kette (light-chain) charakterisiert die ganze Gruppe dieser Proteine, die schwerere H-Kette (heavy-chain) bestimmt die einzelnen Immunglobulinklassen. Beide Ketten weisen einen variablen aminoterminalen Teil, die antigenbindende Region und einen konstanten carboxyterminalen Teil auf (Hilshmann et al., 1975). Diese zwei Ketten bilden, durch Disulfidbrücken verbunden, ein Paar; zwei identische Paare ergeben zusammen ein monomeres Immunglobulin, das IgG. Neben den Polypeptidketten ist auch noch ein Kohlenhydratanteil beim Hühner-IgG von 2,2% (Leslie and Clem, 1969) vorhanden.

Das Molekulargewicht von Hühner-IgG beträgt 170 000 bzw. 174 000 Dalton (Dreesman, 1966; Schraner and Löscher, 1986; bzw. Leslie and Clem, 1969), das der H-Kette 67 500 (Leslie and Clem, 1969) oder 63 000 (Kobayashi and Hirai, 1980) und das der L-Kette 22 000 (Leslie and Clem, 1969) oder 21 000 und 25 000 Dalton (Kobayashi and Hirai, 1980).

Die Sedimentationskonstante beträgt 7,1 S (Leslie and Clem, 1969).

Das IgG des Huhnes unterscheidet sich von dem des Menschen durch Molekulargewicht, Sedimentationskonstante (humanes IgG: MG 150 000, Sed. Konstante 7 S; Roitt, 1977) und durch den niedrigeren isoelektrischen Punkt (I.P. 5,7 Tenenhouse and Deutsch, 1966). Deshalb schlugen Leslie und Clem 1969 vor, dieses Hühnerimmunglobulin als IgY zu bezeichnen. Diese Bezeichnung hat sich aber nicht durchgesetzt, da IgY biologisch und funktionell dem Säuger-IgG entspricht.

Die biologische Funktion des IgG im Serum ist die Neutralisierung von Toxinen und Viren in den Extrazellulärräumen. Durch die Mithilfe des Komplementsystems, das vom IgG aktiviert werden kann, ist es auch zur Bakterio- und Virolyse (Viren mit Hülle) befähigt (v. Fellenberg, 1978).

Das Dotter-IgG stammt aus dem Serum der Legehenne und wird selektiv durch das Folikelepithel des Ovars in den Dotter transportiert (Patterson et al., 1962). Wie Patterson et al. zeigten, benötigen die im Blut zirkulierenden Antikörper 5 bis 6 Tage, bis sie im Dotter des gelegten Eies zu finden sind, etwa die Zeit, die die Reifung eines Dotters dauert. Im Eiklar kommt kein IgG vor, lediglich wenig IgA und IgM (Rose et al., 1974;

Goudswaard et al., 1977a,b; Dohms et al., 1978). Beim befruchteten und bebrüteten Ei ist IgG nach dem 4. Tag im Eiklar und ab dem 12. bis 14. Tag in der Allantois- und Amnionflüssigkeit zu finden (Kramer and Cho, 1970; Rose et al., 1974), ab dem 12. Tag ist IgG im Serum des Embryos nachweisbar (Kaminsky and Durieux, 1956; Kramer and Cho, 1970; Kowalczyk et al., 1985), nicht jedoch die anderen Immunglobuline (Rose et al., 1974). Der Transport von IgG aus dem Dottersack ins Serum des Embryos erfolgt über die Dottersackgefäße (Aa. und Vv. omphalomesentericae) und ist selektiv (Brambell, 1970; Guttman et al., 1971). Am 12. und 17. Tag fanden Rose et al. (1974) in der Amnionflüssigkeit auch IgM und IgA und am 19. Tag der Embryogenese im Darm alle drei Immunglobuline.

Während für Hühner- und Truthuhnküken lediglich das Ei als Immunglobulinquelle dienen kann, bekommen Taubenjunge zusätzlich über die Kropfmilch der Eltern IgA angeboten (Goudswaard et al., 1979).

Im Serum des frisch geschlüpften Kükens ist bis zum 4. Tag nur IgG nachzuweisen, ab dem 4. Tag auch IgM und ab dem 10. bis 12. Tag auch IgA (Martin and Leslie, 1973; Leslie and Martin, 1973). Wann die Neusynthese von IgG beginnt, ist schwierig festzustellen, wahrscheinlich in der ersten Lebenswoche (Leslie, 1975). Bei den Nachkommen der agammaglobulinämischen Legehennen konnte die IgG-Synthese vom 1. Lebenstag an beobachtet werden (Lösch, 1972). Dennoch kommt es in den ersten beiden Lebenswochen zu einem Absinken um 75 bis 100% des zirkulierenden IgGs auf etwa 20%, was auf den Abbau des maternalen IgG und eine noch unzureichende Eigensynthese zurückzuführen ist (Rose and Orlans, 1981). Der Spiegel

steigt durch die zunehmende Eigensynthese bis zur 5. und 6. Woche auf die beim Adulten gefundenen Werte an (van Meter et al., 1969; Martin and Leslie, 1973).

#### 1.2.1.2 Immunglobuline im Ei

Über die Mengen an Immunglobulinen im Eiklar und Eidotter schwanken die Angaben in der Literatur ganz erheblich. So fand Rammensee (1984) 2,9 mg IgG/ml Dotter beim nicht immunisierten Huhn, während Rose et al. (1974) 20 bis 25 mg IgG/ml Dotter bei immunisierten Hühnern fanden, Goudswaard et al. (1978) im Truthuhndotter 5,1 mg/ml IgG. Im Dotter ist weder IgA noch IgM zu finden, lediglich Yamamoto et al. (1975) fanden bei zehnfacher Dotterkonzentrierung IgA und Löscher et al. (1986) in den Eiern der dysgammaglobulinämischen Hühner der UM-B19 Linie 0,11 mg IgA/ml Dotter. Im Gegensatz dazu liegen im Eiklar IgM und IgA vor. Rose et al. (1974) stellten 0,15 mg/ml IgM und 0,7 mg/ml IgA und Rammensee (1984) 0,044 mg/ml IgM und 0,008 mg/ml IgA im Eiklar des Huhnes fest und Goudswaard et al. (1978) fanden 0,024 mg/ml IgM und 0,034 mg/ml IgA im Eiklar des Truthuhnes.

#### 1.2.2 Methoden zur Reinigung von Dotter-IgG in der Literatur

Der schon oben erwähnte scheinbar große Nachteil der Dotter-Antikörper ist die relativ umständliche Verarbeitungsmöglichkeit des Dotters selbst, der neben den Immunglobulinen noch Fett und störende Proteine enthält.

Bisher haben nur Fertel et al. (1981) und Lösch et al. (1986) den Dotter unbehandelt bzw. nur mit Puffer verdünnt zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Alle anderen Autoren beschrieben mehr oder weniger aufwendige Methoden, um den Dotter zu entfetten und unter Umständen das IgG weiter zu reinigen und zu konzentrieren.

An dieser Stelle soll eine Auswahl an Methoden aufgeführt werden.

Lösch et al. (1986) unterschieden prinzipiell die vier folgenden Extraktionsarten:

#### 1.2.2.1 Extraktion der Dotterfette mit lipophilen Lösungsmitteln

An lipophilen Lösungsmitteln fanden vor allem Äther, Chloroform, Aceton und Propanol Verwendung.

Schmittle (1950) und Patterson et al. (1962) extrahierten mit Äther.

Aulisio und Shelokov (1967) mischten Dotter, Puffer und Chloroform im Verhältnis 1:2:4, um so das Fett zu extrahieren. Diesen Vorgang wiederholten sie viermal und erhielten nach dem Abzentrifugieren einen klaren Überstand, der verwendet wurde. Yamaguchi et al. (1981) und Piela et al. (1984) stellten die Lösung genauso her, zentrifugierten nach einer Stunde Inkubation und verarbeiteten den klaren Überstand weiter.

Bade und Stegemann (1984) benutzten 2-Propanol/Aceton zur Extraktion (siehe 2.5.3).

#### 1.2.2.2 Gewinnung von Dotter-IgG durch Salzpräzipitation und /oder Ultrazentrifugation

Bar-Joseph und Malkinson (1980) verdünnten den Dotter 1:2 mit PBS (Posphat-Buffered Solution), zentrifugierten dann 20 Minuten bei 12 000g, verdünnten den klaren Überstand 1:2 mit Glycerin und lagerten den Extrakt bei -20°C bis zur Benutzung.

Loeken und Roth (1983) schlossen an diesen Schritt noch eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge an. Der klare Überstand wurde dazu auf 0,75 M NaCl und 0,128 M Saccharose eingestellt. Nach 18 Stunden Zentrifugation bei 95 000g wurde die klare, flüssige Bodenfraktion gewonnen.

#### 1.2.2.3 Extraktion der Dotterfette mit Dextransulfat und anschließender Konzentrierung mit Neutralsalz

Die Dextransulfatextraktion wurde erstmals von Burstein and Praverman (1957) zur Entfettung des Serums beschrieben.

Jensensus et al. (1981) haben diese Methode modifiziert, der Dotterentfettung angepaßt und eine Fällung und Konzentrierung mit Natriumsulfat angeschlossen (siehe 2.5.1).

#### 1.2.2.4 Gewinnung von Dotter-IgG durch Polyäthylenglykol

Polson et al. (1980, a) beschrieben zum ersten Male die Extraktion von IgG mit Polyäthylenglykol (PEG) 6000. Der Dotter wurde 1:2 mit Puffer verdünnt, PEG in 3.5% Konzentration trennte die Lipide ab. Danach wurde IgG mit 12% PEG aus dem Überstand gefällt und konnte in beliebigem Puffervolumen gelöst werden.

Caroll und Stollar (1983), Altschuh et al. (1984) und Gottstein und Hemmeler (1985) benutzten ebenfalls diese Methode, Song et al. (1985) variierten sie insoweit, als sie statt PEG (6000) PEG (8000) benutzten.

Polson et al. (1985) verbesserten ihre Methode, um auch das restliche PEG, das sie durch Sedimentationsanalyse nachgewiesen hatten, aus der gereinigten IgG-Lösung zu entfernen (siehe 2.5.2).

Zur Herstellung von hochgereinigten Immunglobulinen müssen säulenchromatographische Reinigungsschritte im Anschluß an diese Methoden durchgeführt werden. Dabei werden abwechselnd Ionenaustauscher (z.B. DEAE, Whatman) und Gele für Trennungen nach Molekulargröße (z.B. Ultrogel A6, LKB, Schweden) verwendet.

#### 1.2.3 Anwendungsgebiete der Dotter-Immunglobuline

Für die Dotter-Immunglobuline können zwei große Anwendungsgebiete unterschieden werden:

- a) diagnostische Zwecke
- b) therapeutische Zwecke

#### 1.2.3.1 Anwendung des Dotters für diagnostische Zwecke

Bisher wurden Dotterantikörper zu diagnostischen Zwecken eingesetzt:

##### 1.2.3.1.1 zum Nachweis von Viren und Mykoplasmen

Polson et al. (1980, a) immunisierten Hühner und Kaninchen gleichzeitig gegen verschiedene Pflanzenviren (mit inkomplettem Freud'schen Adjuvans) und boosterten mindestens dreimal im Wochenabstand. Sie konnten nachweisen, daß die Hühner mindestens so gute Serumantikörpertiter bildeten wie die Kaninchen, die Antikörpertiter im Dotter lagen meist leicht höher als die des Serums.

Bar-Joseph und Malkinson (1980) haben ebenfalls gegen Pflanzenviren (citrus tristeza virus oder tabaco mosaic virus-avocado isolate) immunisiert und konnten die aus dem Dotter gewonnenen Antikörper im ELISA mit guter Spezifität einsetzen.

Gardener und Kaye (1982) stellten die ersten kommerziellen Nachweisreagentien aus Eidotterantikörpern her. Sie gewannen dazu Antikörper gegen verschiedene, in der Humanmedizin relevante Viren (Influenza A und B, Parainfluenza 1 und 3, Adenovirus-Gruppe und Rotavirus). Sie wiesen darauf hin, daß diese Antikörper in großer Menge (0,5 Liter/Huhn/Monat) zu gewinnen seien, und zeigten, daß diese mit großer Spezifität in der Immunofluoreszenztechnik einzusetzen waren.

Piela et al. (1984) haben Serum- und Dotter-Antikörpertiter von Hühnern verglichen, die Newcastle Disease Virus (NDV), Infektiösem Bronchitisvirus (IBV) oder Mycoplasma gallisepticum (MG) ausgesetzt waren. In allen Fällen war im Dotter ein signifikanter Titer Spiegel zu finden, so daß sie Eier statt Serumproben untersuchen konnten, um Impferfolge oder Durchseuchungsgrad der Geflügelpopulation zu kontrollieren.

Mohammed et al. (1986, a/b) haben einen ELISA zum Nachweis von Antikörper gegen Mycoplasma gallisepticum und M. synovia entwickelt. Sie zeigten, daß bei der Untersuchung in Spezifität und Empfindlichkeit der Antikörper zwischen Serum und mit Chloroform entfettetem Dotter kein Unterschied zu sehen war, so daß zur Bestimmung des Durchseuchungsgrades der Geflügelpopulation Dotter- statt Blutproben eingesetzt werden konnten.

#### 1.2.3.1.2 zum Nachweis von Proteinen

Polson et al. (1980, b) haben Hühner mit verschiedenen Proteinen (Molekulargewicht zwischen  $8 \times 10^6$  und kleiner als  $2 \times 10^4$ ) immunisiert und festgestellt, daß sie bei Molekulargewichten größer als 150 000 Dalton sehr gut und im Bereich zwischen 150 000 und 30 000 mäßig Antikörper bildeten und in den Dotter übertrugen. Sie immunisierten vergleichend Hühner und Kaninchen mit Cobragift (Molekulargewicht kleiner 20 000), wobei die Hühner niedrigere Antikörpertiter als die Kaninchen aufwiesen. Hinzu kam, daß die Antikörper aus dem Dotter bei Mäusen keine Schutzwirkung zeigten, im Gegensatz zu denen aus dem Serum der Kaninchen.

#### 1.2.3.1.3 zum Nachweis von Echinococcose

Gottstein und Hemmeler (1985) infizierten Hennen und Kaninchen mit *Echinococcus granulosus*. Die Kaninchen-serum- und die Dotterantikörper reagierten in der Immunelektrophorese gleich. Allerdings konnte im gleichen Zeitraum, in dem den Kaninchen eine subletale Menge Blut abgenommen wurde, aus den Dottern etwa das achtzehnfache an Antikörpern gewonnen werden.

#### 1.2.3.1.4 zum Nachweis von Immunglobulinen

Altschuh et al. (1984) haben mit humanem IgM und IgA immunisiert und konnten die Dotter-Antikörper in der Rocket-Immunelektrophorese einsetzen, um humanes IgM und IgA zu quantifizieren, da die aviären Antikörper auf Grund ihres um eine pH-Einheit niedrigeren isoelektrischen Punktes bei pH 5,5 bis 6,0 nicht wandern, im Gegensatz zu den Immunglobulinen der Säuger.

Jensenius et al. (1981) haben gegen Kaninchen IgG und IgA Dotterantikörper gewonnen und setzten diese nach einer Dextransulfatreinigung mit anschließender Natriumsulfatkonzentrierung für den Radio-Immuno-Assay (RIA) ein.

#### 1.2.3.1.5 zum Nachweis von Hormonen und Gewebshormonen

Vieira et al. (1984) isolierten humanes Parathormon und konnten aus dem Eidotter dagegen Antikörper gewinnen, die nach Reinigung über Salzpräzipitation im RIA eingesetzt wurden.

Fertel et al. (1981) ließen von entsprechend immunisierten Hühnern gegen eine Reihe von Prostaglandinen (AA, PGA, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>1&2</sub>, PGF<sub>1&2</sub>, TBX<sub>2</sub>) Antikörper bilden, die nur eine geringe Kreuzreaktion aufwiesen. Der Dotter wurde für den Einsatz im RIA lediglich verdünnt.

#### 1.2.3.1.6 zum Nachweis von Enzymen

Caroll und Stollar (1983) beschrieben die erfolgreiche Anwendung von Antikörpern aus dem Hühnerdotter gegen Kälberthymus RNA-Polymerase II, die sich weder in Kaninchen noch in Guinea-pigs als antigen erwiesen hatte (Ingles, 1973). Monoklonale Antikörper existieren noch nicht gegen alle Untereinheiten dieses Säugerenzyms. Die Antikörpertiter des Dotters waren denen des Hühnerserums gleichwertig, doch konnte eine größere Menge pro Zeiteinheit gewonnen werden, ohne die Tiere zu töten.

#### 1.2.3.1.7 zum Nachweis von Rezeptoren

Song et al. (1985) immunisierten Kaninchen und Hühner mit Insulinrezeptoren des Menschen; nur bei letzteren fanden sie Antikörper. Sie wurden aus dem Dotter durch Reinigung und Konzentrierung mit PEG (8000) gewonnen und konnten auch bei anderen Spezies eingesetzt werden.

### 1.2.3.2 Einsatz zu therapeutischen Zwecken

Der Einsatz von Eiern als Medikament in Prophylaxe und Therapie wurde schon lange vor dem Wissen um Antikörper und passive Immunisierung angewendet.

Schon im 4. Jh.v.Chr. wurden in der "Mulomedicina Chironis" (Schwarzer, 1976) und in dem "Corpus Hippiatricorum Graecorum" (3. bis 5. Jh.v.Chr.) Eier als Therapeutika eingesetzt. So wurde beispielsweise als Trank gegen die Gallenbrechruhr ein Gemisch aus Wein, Öl, Honig und zwölf Eiern empfohlen, oder als "ein winterlicher Trank", für den neben einigen anderen Zutaten "Eier, wie viele du willst" verabreicht wurden (Schäffer, 1981).

Bartz et al. (1980) berichteten von Farmern, die ihren Durchfallkälbern rohe Eier farmeigener Hühner verfütterten, so die Jungtiere passiv gegen Diarrhoeerreger schützten und deutliche Heilungserfolge aufwiesen. Bartz et al. immunisierten Hühner mit Rotavirus und verfütterten die aus dem Dotter gewonnenen Antikörper an junge Mäuse, die mit dem Erreger der 'epidemic diarrhoe of infant mice' (EDIM) infiziert waren. Die Autoren konnten nachweisen, daß durch diese orale Applikation die Infektionsrate von über 90% auf 15% sank.

### 1.3 Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene Extraktionsverfahren in Hinblick auf die qualitative und quantitative IgG-Ausbeute, auf Kosten und technischen Aufwand untersucht und verglichen werde.

Die IgG-Gehalte und Antikörperkonzentrationen in Dotter und Serum sollen über den Zeitraum vom Tag der Immunisierung bis zum siebzigsten Tag p.i. einander gegenübergestellt werden.

Außerdem soll die Tenazität des Dotter-IgG gegenüber verschiedenen Salzsäurekonzentrationen bei unterschiedlicher Einwirkungszeit festgestellt werden.

Weiterhin soll die Stabilität des Dotter-IgG gegenüber Wärmeeinwirkung geprüft werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiermaterial

#### 2.1.1 Tiere und Haltung

Für die Untersuchungen dienten zehn Leghornhühner im Legealter. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen einzeln auf Gitterrosten gehalten und erhielten pelletiertes Legehennenalleinfutter und Trinkwasser ad libitum.

#### 2.1.2 Antigen und Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte mit Humanserumalbumin (HSA) (Human Albumin, Behringwerke AG, Marburg/Lahn). Die Hühner wurden am Tag  $t_0$  mit 20 mg HSA/kg Körpergewicht mit komplettem Freud'schen Adjuvans (FCA) intramuskulär (M. pectoralis) immunisiert und am 28. Tag mit 20 mg HSA/kg Körpergewicht ohne FCA geboostert.

#### 2.1.3 Serumgewinnung

Von jedem Huhn wurden am 0., 7., 14., 21., 28., 35., 42., 49., 56., 63. und 70. Tag nach der Erstimmunisierung je 5 ml Blut durch Punktion der Vena cutanea ulnaris gewonnen. Das Blut wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 7000 U/min. Das Serum wurde in Polystyrolröhrchen bei -20°C bis zur Weiteruntersuchung aufbewahrt.

#### 2.1.4 Eiergewinnung

Bedingt durch die Einzeltierhaltung konnte jedes Ei seiner Henne zugeordnet werden. Die gelegten Eier wurden den Käfigen auf den Kontrollgängen morgens und abends entnommen, mit Datum und Hennenummer versehen und hernach bei 4°C bis zur Bearbeitung gelagert.

#### 2.2 Standardherstellung und Eichung

Der zu dieser Arbeit verwendete IgG-Standard wurde aus einer Dotterlösung hergestellt.

Dazu wurden die Dotter mehrerer Eier gepoolt, mit Tris-Buffered Saline (TBS siehe S.21) 1:5 verdünnt und die Fette durch Fällung mit Dextransulfat (siehe 2.5.1) entfernt. Die klare Lösung wurde durch Druckfiltration (Amicon) auf 50 ml, die anfangs eingesetzte Dottermenge konzentriert. Es wurde ein Filter mit einer Ausschlußgrenze von 100 000 Daltons verwendet. Diese Lösung wurde 24 Stunden gegen TBS dialysiert und danach bei -20°C gelagert und diente in Verdünnungen als Standardlösung.

Um diese Standardlösung zu eichen, wurde eine hochgereinigte IgG-Lösung hergestellt.

Dazu wurde ein Teil dieser Lösung konzentriert und an Ultragel A6 (LKB, Schweden) chromatographiert. An die Säule angeschlossen waren ein Fraktionssammler, ein Durchflußphotometer (280 nm) und ein Schreiber. Der Durchlauf wurde in 2 ml-Portionen aufgefangen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe des Ouchterlony-Testes (siehe 2.3.1) auf das Vorhandensein von IgG geprüft. Die IgG-Fraktionen mit dem höchsten

Proteingehalt wurden gepoolt und 24 Stunden gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0 (siehe S.21) umdialysiert. Zur weiteren Reinigung wurden die IgG-Fractionen auf eine Anionenaustauschersäule aufgetragen, gefüllt mit DEAE 52 Cellulose (Whatmann) in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 8,0. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten, d.h. es wurde 0,01 M Phosphatpuffer pH 8,0 mit steigender Natriumchlorid-Molarität eingesetzt. Die nächsthöhere Konzentration wurde erst angelegt, wenn der Schreiber nach einem Peak die Ausgangslinie wieder erreicht hatte.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Ouchterlony-Test geprüft und die IgG-Peaks identifiziert. Die Einzel-fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden erneut gepoolt und mit Druckfiltration (Amicon) auf 4 ml konzentriert. Der Reinheitsgrad dieses Konzentrates wurde mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 2.3.3) getestet. Da nur eine Bande zu sehen war, enthielt die Lösung nur eine Proteinfraction, das IgG. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976, siehe 2.4.1.1) in mg/ml Lösung bestimmt. Mit dieser quantifizierten Reinsubstanz wurde in der Rocket-Immunelektrophorese (siehe 2.4.2) der IgG-Gehalt der Standardlösung bestimmt.

### 2.2.1 Puffer und Lösungen

#### TBS (Tris-Buffered Saline)

8,14 g Natriumchlorid  
1,211 g Tris-Hydroxymethylaminomethan  
1,0 g Natriumazid  
ad 100 ml aqua bidest  
mit konz. Salzsäure auf pH 7,4 einstellen.

#### PBS (Phosphat-Buffered Saline)

0,80 g Natriumchlorid  
0,020 g Kaliumchlorid  
0,144 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat  
0,020 g Kaliumdihydrogenphosphat  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Phosphatpuffer 0,1 M pH 8,0

0,1126 g Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat  
2,0957 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat  
ad 100 ml Aqua bidest.

### für Elektrophorese nach Laurell

#### Tris-Barbiturat-Puffer pH 8,6

2,24 g Diäthylbarbitursäure  
4,43 g Tris  
0,0533 g Calcium-Lactat  
0,065 g Natriumazid  
ad 100 ml Aqua bidest.

### für SDS-Page Elektrophorese

#### Acrylamidlösung (30 %)

29,2 g Acrylamid  
0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid  
0,01 mg Bromphenolblau  
25,0 g Glycerin  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Gelpuffer pH 8,8

18,17 g Tris-HCl  
0,4 g SDS  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Probenpuffer pH 8,8

10,0 g Glycerin  
2,3 g SDS  
0,76 g Tris-HCl  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Elektrophoresepuffer pH 8,3

3,09 g Tris  
14,41 g Glycin  
0,1 g SDS  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Ammoniumperoxodisulfat

10 g Ammoniumperoxodisulfat  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### Puffer und Lösungen für ELISA

#### Natrium-Carbonat-Puffer pH 9,6 zum Beschichten der Platten

0,837 g Natriumcarbonat-10-Hydrat  
0,600 g Natriumhydrogencarbonat  
0,020 g Natriumazid  
ad 100 ml Aqua bidest.

#### PBS-Tween pH 7,4

0,80 g Natriumchlorid  
0,02 g Kaliumchlorid  
0,144 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-Hydrat  
0,020 g Kaliumdihydrogenphosphat  
0.05 ml Tween 20  
ad 100 ml Aqua bidest.

### Substratlösung

2 mg p-Nitrophenylphosphat (Fa. Serva, Heidelberg)  
gelöst in einem Milliliter 1:10 verdünntem AMP-Puffer  
(2 Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer, Fa. Sigma, München).

### Antigenlösung

HSA (Humanserumalbumin, Fa. Böhringer, Mannheim) wird  
in einer Konzentration von 100 mg/ml Natriumcarbonat-  
Puffer gelöst.

### für Affinitätschromatographie

#### Kopplungspuffer pH 6,6

14,2 g Dinatriumhydrogenphosphat  
29,25 g Natriumchlorid.

#### Startpuffer 0,1 M, pH 7,0

0,56 g Kaliumdihydrogenphosphat  
2,10 g Dinatriumhydrogenphosphat  
1,46 g Natriumchlorid  
0,02 g Natriumazid  
0,5 ml Tween 80  
ad 100 ml Aqua bidest.

Glycinpuffer 0,2 M, pH 8,0

1,5 g Glycin  
ad 100 ml Aqua bidest.

Natriumdihydrogencarbonatpuffer pH 8,3

8,5 g Natriumdihydrogencarbonat  
29,2 g Natriumchlorid.

Acetatpuffer 0,1 M, pH 4,0

0,136 g Natriumacetat  
83,4 ml Essigsäure 0,1 M  
2,92 g Natriumchlorid  
ad 100 ml Aqua bidest.

Elutionspuffer

17,5 g Ammoniumhydroxid.

## Färbe- und Entfärbelösungen

### Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung

0,2 mg Coomassie Brilliant Blau G-250  
50 ml Äthanol 60 %  
40 ml Aqua bidest  
10 ml Eisessig.

### Entfärber

40 ml Äthanol 60 %  
50 ml Aqua bidest  
10 ml Eisessig.

### Amidoschwarz-Ölrot

0,05 g Amidoschwarz 10 B  
2 ml Eisessig  
ad 100 ml Äthanol 60%, mit Ölrot gesättigt (0,2-0,3 g).

## 2.3 Qualitative Methoden

### 2.3.1 Ouchterlony (1962)

Im Ouchterlony-Test entsteht durch Diffusion von Antigen und Antikörper gegeneinander eine Präzipitationslinie, die zur qualitativen Identifikation dient.

Auf einer entfetteten und gereinigten Glasplatte (10 x 10 cm) wurden 20 ml heißer 1%iger Agarose (high EEO, Serva, Heidelberg) in 1:5 verdünntem Tris-Barbiturat-Puffer (siehe S.22) aufgetragen und nach dem Erkalten rosettenförmig sieben Löcher ausgestanzt. In das mittlere Loch wurden 10 µl monovalentes Antiserum (Anti-Hühner-IgG) pipettiert und in die anderen Löcher jeweils 10 µl der zu untersuchende Probe. Als Positivkontrolle diente der Standard. Nach 12 bis 24 Stunden Inkubationszeit in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur, konnte das Ergebnis meist schon ohne Färbung abgelesen werden. Wenn die Präzipitate zu schwach ausgeprägt waren, erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue G-250 (Serva, Heidelberg), die genaue Technik ist unter 2.4.2 beschrieben.

### 2.3.2 Zweidimensionale Immunelektrophorese (Laurell, 1965)

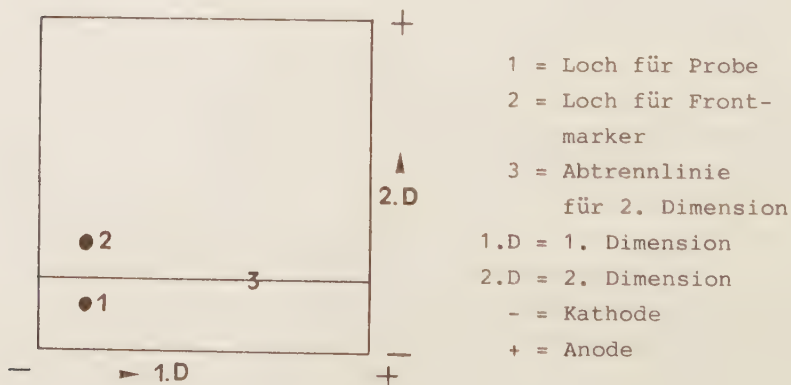
Die zweidimensionale Elektrophorese diente zur Bestimmung des immunologischen Reinheitsgrades der Endprodukte aus den verschiedenen Extraktionsverfahren.

Im ersten Elektrophoreseschritt wurde in Antiserum freier Agarose das Proteingemisch nach Ladung und

Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür wurden 2 Löcher (siehe Skizze) gestanzt, eines für die Probe und eines für den Frontmarker Ferritin. In einer gekühlten Kammer bei 10 Volt/cm Feldstärke dauerte der erste Lauf so lange, bis das Ferritin eine Laufstrecke von 5,5 cm zurückgelegt hatte.

In der zweiten Dimension kam es zwischen den getrennten Proteinfractionen und den Antikörpern des polyvalenten Antiserums zu präzipitierenden Antigen-Antikörperreaktionen, die sich als bergspitzenähnliche Präzipitate darstellen ließen. Es wurde ein 3 cm breiter Agarosestreifen mit den aufgetrennten Proteinen stehen gelassen und die restliche Agarose durch Antiserum enthaltende Agarose ersetzt (1% Agarose C in 12,25 ml Tris-Barbiturat-Puffer 1:5 verdünnt und 0,75 ml polyvalentes Kaninchen-Anti-Hühner-Serum). Die Laufzeit betrug 14 bis 16 Stunden bei einer Feldstärke von 1 Volt/cm, Kühlung war nicht unbedingt erforderlich. Weitere Behandlung siehe 2.4.2, gefärbt wurde mit Amidoschwarz-Ölrot.

Abb. 1



### 2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970), modifiziert

Im SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine nach Molekulargewicht getrennt.

Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) umgibt die Proteine als bipolares Detergent mit einer nach außen stark negativen Hülle, so daß ihre Eigenladungen überdeckt sind und die elektrophoretische Trennung vom Molekulargewicht der Proteine und der Porengröße des Gels abhängt. Durch entsprechende Färbung werden die einzelnen Proteine als Banden sichtbar gemacht und die Molekulargewichte können an Hand des mitgelaufenen Standards bestimmt werden.

Alle Gele wurden als lineare Gradientengele von 3 bis 15 Prozent gegossen, d.h. die Porengröße im Gel nahm linear von oben nach unten ab. Proteine mit Molekulargewichten zwischen  $9 \times 10^5$  und  $1,8 \times 10^4$  konnten gut getrennt werden.

Die Polyacrylamidgele wurden zwischen zwei senkrechtstehenden Glasplatten (150 x 160 mm) gegossen, die am Rand durch Plexiglasspacer auf 1,2 mm Abstand gehalten wurden, welche gleichzeitig die seitliche Begrenzung darstellten. Die 15%ige und 3%ige Acrylamidlösungen wurden im Gradientenmischer linear gemischt und in den Zwischenraum eingefüllt. Die Acrylamidkonzentration des Gels lag am unteren Rand bei 15% und endete am oberen Rand mit drei Prozent. Für die 15%ige Acrylamidlösung wurden 15 ml der 30%igen Acrylamidlösung, 7,5 ml Aqua bidest, 7,5 ml Gelpuffer und 100 µl Ammoniumperoxodisulfat gemischt und nach mindestens 1minütigem Entgasen (mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe) 15 µl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Fa. Serva, Heidelberg) zugegeben (Puffer und Lösungen siehe S.22/23).

Die 3%ige Gellösung wurde aus 3 ml 30%igen Acrylamidlösung, 19,5 ml Aqua bidest, 7,5 ml Gelpuffer, 100 µl Ammoniumperoxodisulfat und 15 µl TEMED hergestellt.

Die Polymerisation erfolgte durch Ammoniumperoxodisulfat und TEMED und war nach ungefähr 2 Stunden beendet.

Durch einen Kamm mit 13 rechteckigen Zinken (ca. 5 x 7 mm) für die Probestaschen wurde der obere Teil des Gels abgeschlossen.

Die Proben wurden 1:2 mit Probenpuffer verdünnt aufgetragen. Danach wurden die Probestaschen vorsichtig mit Elektrophoresepuffer (siehe S.23) aufgefüllt.

Als Marker liefen mit:

- 340 kD -  $\alpha_2$ - Makroglobulin
  - 220 kD - Ferritin
  - 170 kD -  $\alpha_2$ - Makroglobulin-Untereinheit
  - 97,4 kD - Phosphorylase b
  - 67 kD - Bovines Serumalbumin
  - 36 kD - Lactatdehydrogenase-Untereinheit
- (High molecular Kit, Pharmacia, Schweden).

Zum Einwandern der Proteine in das Gel wurde für ca. 15 Minuten eine Stromstärke von 20 mA angelegt und danach auf 40 mA erhöht.

Der Lauf war beendet, wenn die Farbfront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde den Platten entnommen, ca. 30 Minuten gefärbt und über Nacht entfärbt.

## 2.4 Quantitative Methoden

### 2.4.1 Proteinbestimmung:

#### 2.4.1.1 nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay durch geführt.

Das Prinzip der Proteinbestimmung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums der angesäuerten Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung mit Protein.

Das Farbkonzentrat enthält neben Coomassie-Brilliant-Blue G-250, Phosphorsäure und Methanol und wurde zum Gebrauch 1:4 mit Aqua bidest verdünnt. 50 µl der Probe wurden mit 2,5 ml der verdünnten Reagenzlösung gemischt und nach 5 Minuten gegen den Leerwert (50 µl Puffer und 2,5 ml Reagenz) bei 595 nm gemessen.

Zur Erstellung der Eichkurve diente bovines Gamma-globulin in PBS (siehe S.21) gelöst. Der Korrelationskoeffizient (R) betrug 0,9998 (siehe Abb.2, S.32).

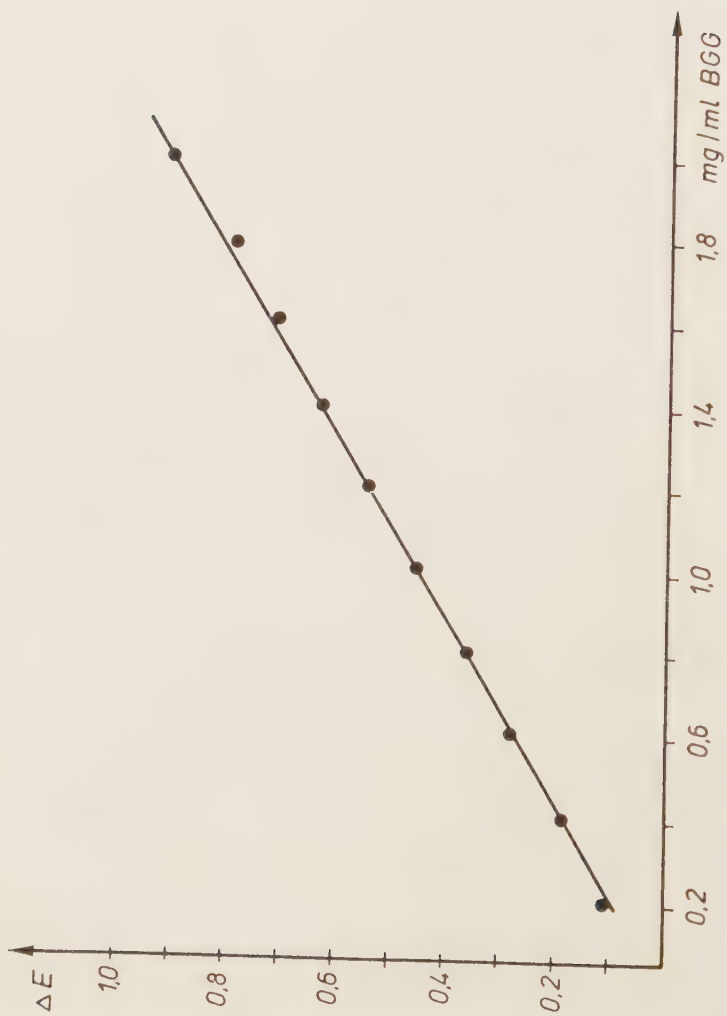


Abb. 2

Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

$\Delta E$  = Extinktion gemessen bei 595 nm

BGG = bovines Gammaglobulin

Korrelationskoeffizient ( $R$ ) = 0,9998

#### 2.4.1.2 nach Lowry (1951), modifiziert

Für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) wurden folgende Reagenzien benötigt:

- 2% heißes SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)
- alkalisches Kupfer-Reagenz
  - 1 ml 2% Kalium-Natrium-Tatrat
  - 1 ml 1% Kupfersulfat
  - ad 100 ml 2% Natriumcarbonat in 0,1 M Natronlauge
- Folin-Ciocalteus-Reagenz (Merk 9001) (1:2 verdünnt)

Zu 10 µl Probe und 90 µl Aqua bidest wurden 100 µl heißes 2% SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) und nach Mischen 1 ml alkalisches Kupfer-Reagenz (1:2 verdünnt mit Aqua bidest.) zugegeben. Nach erneutem Schütteln und 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl Folin-Reagenz (1:2 mit Aqua bidest) untergemischt. Die Extinktion wurde nach 30 Minuten bei 760 nm im Photometer gemessen.

Die Eichkurve wurde aus verschiedenen Verdünnungen mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt.

#### 2.4.2 Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966)

Die Bestimmung der IgG-Konzentration erfolgte durch die Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966).

Der Tris-Barbiturat-Stammpuffer (siehe S.22) wurde 1:5 verdünnt, mit 1% Agarose C (Pharmacia, Schweden) zum Sieden gebracht und danach im Wasserbad auf 58°C abgekühlt. Jeweils 15 ml wurden mit 100 µl monospezifischem Antiserum (Anti-Hühner-IgG von der Ziege) versetzt und

auf eine 10 x 10 cm große, entfettete, einseitig mit eingebrannter Agarose beschichtete Glasplatte aufgetragen, so daß eine gleichmäßig dicke (ca. 2 mm) Agaroseschicht entstand. In diese wurden 15 Löcher (0,2 mm) gestanzt, 5 für die Standardverdünnungen und 10 für die zu untersuchenden Proben. Das einpipettierte Volumen betrug 4 µl je Loch.

Der Tris-Barbiturat-Puffer wurde 1:4 verdünnt als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer verwendet.

Die Feldstärke betrug 1 Volt/cm, die Laufzeit 14 bis 16 Stunden und 24 Stunden bei den Versuchen zur Salzsäuretenazität (2.7) des Dotter-IgG.

Nach beendetem Elektrophoreselauf wurden die Platten 60 Minuten, bei den Versuchen 2.7 24 Stunden, in 0,9% Natriumchlorid-Lösung gewässert. Danach wurden sie zweimal eine halbe Stunde mit Aqua dest. befeuchtetem Filterpapier bedeckt gepresst und nach dem Trocknen im Warmluftstrom (Föhn) gefärbt.

Die Färbedauer in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (siehe S.26) betrug vier Minuten. Die Platten des Versuchs 2.7 wurden mit Amidoschwarz-Ölrot (siehe S.26) mindestens zwei Stunden gefärbt. Eine Entfärbung war nicht nötig.

Die Länge der Präzipitate wurde im Durchlicht bestimmt, und mit Hilfe der "Linearen Regression" an Hand der fünf mitgelaufenen Standardverdünnungen in Immunglobulin-konzentration (mg/ml) umgerechnet.

#### 2.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

(ELISA, Engvall and Perlman, 1972), modifiziert

Bei dieser Methode nutzt man die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion mehrfach hintereinander aus, um die Menge eines Antigens (AG) zu quantifizieren. Bei dieser Sandwich-Methode ist der letzte Antikörper (AK) mit einem Enzym gekoppelt, das eine im Photometer meßbare Farbreaktion katalysiert. Die Farbintensität und die Antikörperkonzentration stehen bei entsprechend starker Verdünnung in einem linearen Verhältnis.

Prinzipiell finden folgende Reaktionen statt:

Das Antigen wird an die Polystyrolwände der Micro-ELISA-Platte adsorbiert und dazu die zu untersuchende Antikörper enthaltende Substanz gegeben. Es findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Im nächsten Schritt wird ein enzymmarkierter Antikörper zugegeben, der monospezifisch gegen den ersten Antikörper oder einen Teil von diesem (entweder gegen IgG, IgA oder IgM) gerichtet ist. So wird spezifisch eine bestimmte Antikörperfraktion herausgegriffen. Danach wird das Substrat zugegeben, das, bedingt durch das Enzym, eine Farbveränderung erfährt, die nach einer bestimmten Zeit gestoppt und photometrisch gemessen wird.

Die Farbintensität ist direkt abhängig von der Menge des Enzyms und diese wiederum von der Konzentration des zu bestimmenden Antikörpers.

## Durchführung des ELISA

Als erstes wurden die ELISA-Platten mit HSA (100 µg HSA/ml Natriumcarbonatpuffer) beschichtet, dazu wurden 200 µl Antigenlösung in jede Kavität gegeben. Jede Platte wurde mit Parafilm abgedeckt, bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit PBS-Tween-Lösung, mit Trockenklopfen.

In die Reihen 3 bis 12 wurden in jede Kavität 50 µl PBS-Tween vorgelegt, Reihe 1 blieb als Nullwert leer und in Reihe 2 wurden 100 µl Proben aufgetragen, vorverdünnt oder pur. Die mit Parafilm abgedeckten Platten wurden unter Rotation bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden in jede Kavität 100 µl Anti-Hühner-IgG-Enzymkonjugat (1:500) gegeben. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C unter Rotation, Wasch- und Trockenschritt wurden 200 µl Substratlösung in jede Kavität pipettiert, nach 10 Minuten wurde die Enzymreaktion mit 50 µl 1 N Natronlauge gestoppt. Im Titertek (Fa. Flow Laboratories) Ablesegerät wurde die Extinktion jeder Kavität bei 405 nm gegen den Nullwert - die erste Reihe - gemessen (Lösungen und Puffer siehe S. 23/24).

## Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung fand in Anlehnung an das von Caulfield und Shaffer (1984) beschriebene Computerprogramm statt. Die Extinktion von 0,1 wurde als Titerpunkt gewählt, dazu wurde von den beiden Extinktionen um 0,1 auf diesen Wert interpoliert. Der Titer wurde als  $-\log 2$  der entsprechenden Verdünnungsstufe angegeben. Alle Proben wurden 1:20 vorverdünnt.

## 2.5 Isolierung und Reinigung der Immunglobuline

### 2.5.1 Dextransulfat-Fällung

(Jensenius et al., 1981)

Die Methode nach Jensenius et al. (1981; Abb. 3, S.39) lehnt sich im ersten Schritt an die Methode von Burstein und Parverman (1957) an, Lipoproteine aus dem Serum zu isolieren. Der separierte und vom Eiklar gereinigte Dotter wurde 1:5 mit TBS (Tris-Buffered Saline; siehe S.21) verdünnt. Die groben Bestandteile der Dotterlösung wurde abzentrifugiert (20 min., 5000 g, 20°C). Zum Überstand wurden 3 ml Dextransulfat (10% w/v) pro 10 ml Dotter und nach 20minütiger Rührinkubation bei Raumtemperatur 7,5 ml einer 1M Calciumchlorid-Lösung pro 10 ml Dotter zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation wurde zentrifugiert und der Überstand (Überstand A) aufbewahrt. Das Sediment wurde erneut mit 50 ml TBS pro 10 ml Dotter aufgenommen, gut gemischt und zentrifugiert. Der Überstand (Überstand B) wurde mit A gepoolt und mit TBS ad 100 ml pro 10 ml Dotter eingestellt.

Nach diesem Entfettungsschritt mit Dextransulfat wurde die Probe halbiert und die beiden Teile unterschiedlich weiter verarbeitet:

#### 1. Konzentrierung und Anreicherung durch Fällung mit Natriumsulfat

In den Überstandpool wurden 20 g Natriumsulfat pro 10 ml Dotter eingewogen, bei minimalem Erwärmen gelöst und 30 Minuten lang inkubiert. Das Sediment

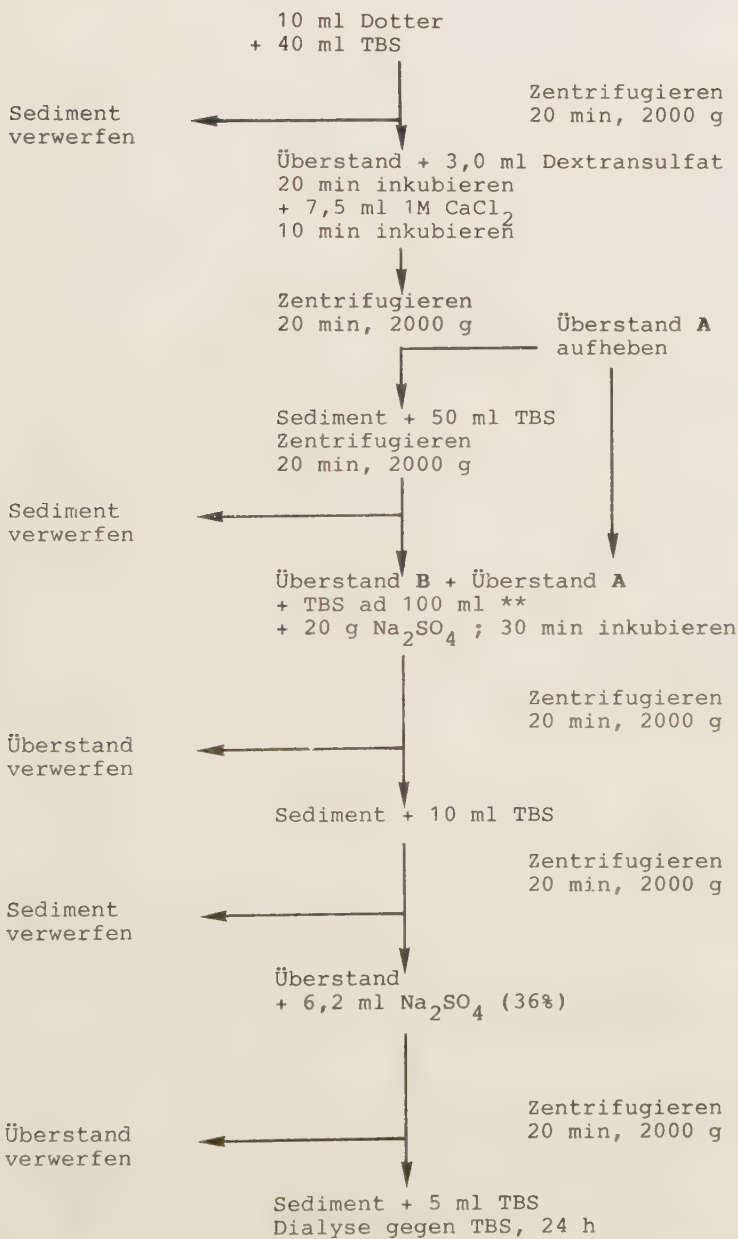
wurde in 10 ml TBS aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von 6,2 ml Natriumsulfat (36% w/v) auf eine 14%ige Natriumsulfat-Lösung eingestellt. Nach Zentrifugation wurde der Bodensatz mit TBS aufgenommen, 24 Stunden gegen TBS dialysiert und danach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2. Reinigung durch Antihühner- $\gamma$ -Affinitätschromatographie

Der Dotterpool wurde 36 Stunden gegen 0,9 % Natriumchlorid-Lösung dialysiert und danach gegen Startpuffer (siehe S.24) umdialysiert. Die Durchführung des Säulenlaufes ist unter 2.5.4 beschrieben. Die gereinigte Lösung wurde gegen TBS dialysiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Abb. 3

**Dextransulfat-Extraktion**  
(Jensenius et al., 1981)



\*\* Alternativ wurde hier ein affinitätschromatographischer

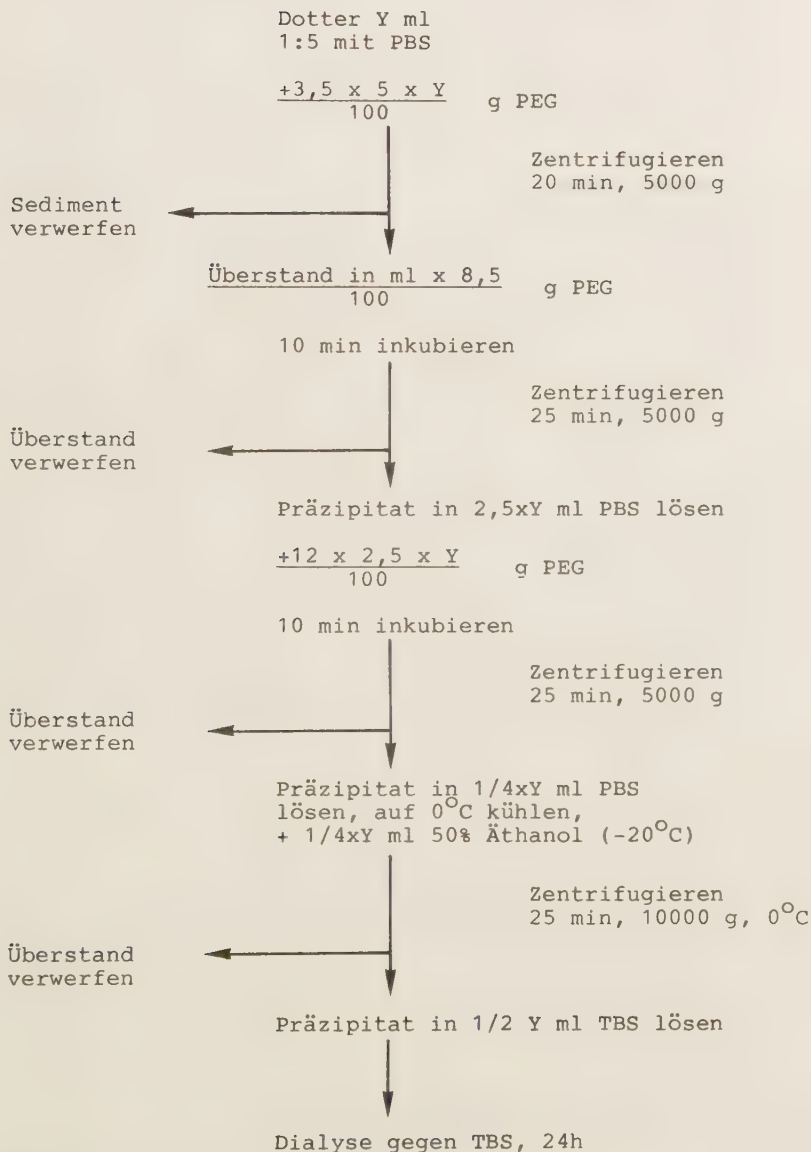
### 2.5.2 Fällung mit Polyäthylenglykol (PEG)

(Polson et al., 1985; Abb.4, S.41)

Der Dotter wurde vom Eiklar und der Dotterhaut befreit und 1:5 mit PBS (Phosphat-Buffered Saline) verdünnt. Im ersten Schritt wurde das Fett durch eine 3,5% PEG-Lösung gefällt. Nach dem Zentrifugieren (20 min, 2000g, 20°C) wurde in den Überstand 8,5% PEG in pulverisierter Form eingewogen, so daß die Lösung 12% PEG enthielt. Nach 10minütiger Inkubation wurde zentrifugiert und das Präzipitat mit dem 2,5fachen der eingesetzten Dottermenge an Puffer gelöst und nochmals eine 12% PEG-Konzentration hergestellt. Nach Inkubation und Zentrifugation lag das IgG gereinigt im Präzipitat vor und mußte noch von dem überschüssigen PEG befreit werden. Dies geschah durch Lösen des Niederschlages in einigen Millilitern PBS, Abkühlen auf 0°C und Zugabe der gleichen Menge auf -20°C gekühlten Äthanol. Nach Zentrifugation war das Präzipitat frei von PEG.

Es wurde in der gewünschten Puffermenge aufgenommen und 24 Stunden gegen den Puffer dialysiert.

**PEG-Dotter-Extraktion**  
(Polson et al., 1985)



### 2.5.3 Dotterentfettung mit Propanol/Aceton

(Bade und Stegemann, 1984; Abb.5, S.43)

Der Dotter wurde gekühlt und, vom Eiweiß befreit, unverdünnt verarbeitet. Der Dotter (20 g) wurde mit 100 ml auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltem 2-Propanol gemischt und 2 Minuten gerührt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit dem präzipitierten Protein wieder in 100 ml 2-Propanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gelöst. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt, danach wurde das Präzipitat zweimal in auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltem Aceton aufgenommen. Der letzte Bodensatz wurde quantitativ auf einen Büchnerfilter mit Filterpapier Nr. 602h (Schleicher und Schüll) gegeben und mit wenig Aceton nachgewaschen. Das Filterpapier mit dem feuchten Pulver wurde im Wärmeluftstrom (Föhn) vorsichtig getrocknet. Das Aceton trocknenpulver wurde in 40 ml TBS gelöst, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und danach 15 Minuten bei 25 000g und  $10^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde im Vakuum so lange gegen TBS dialysiert, bis sich der Acetongeruch verloren hatte.

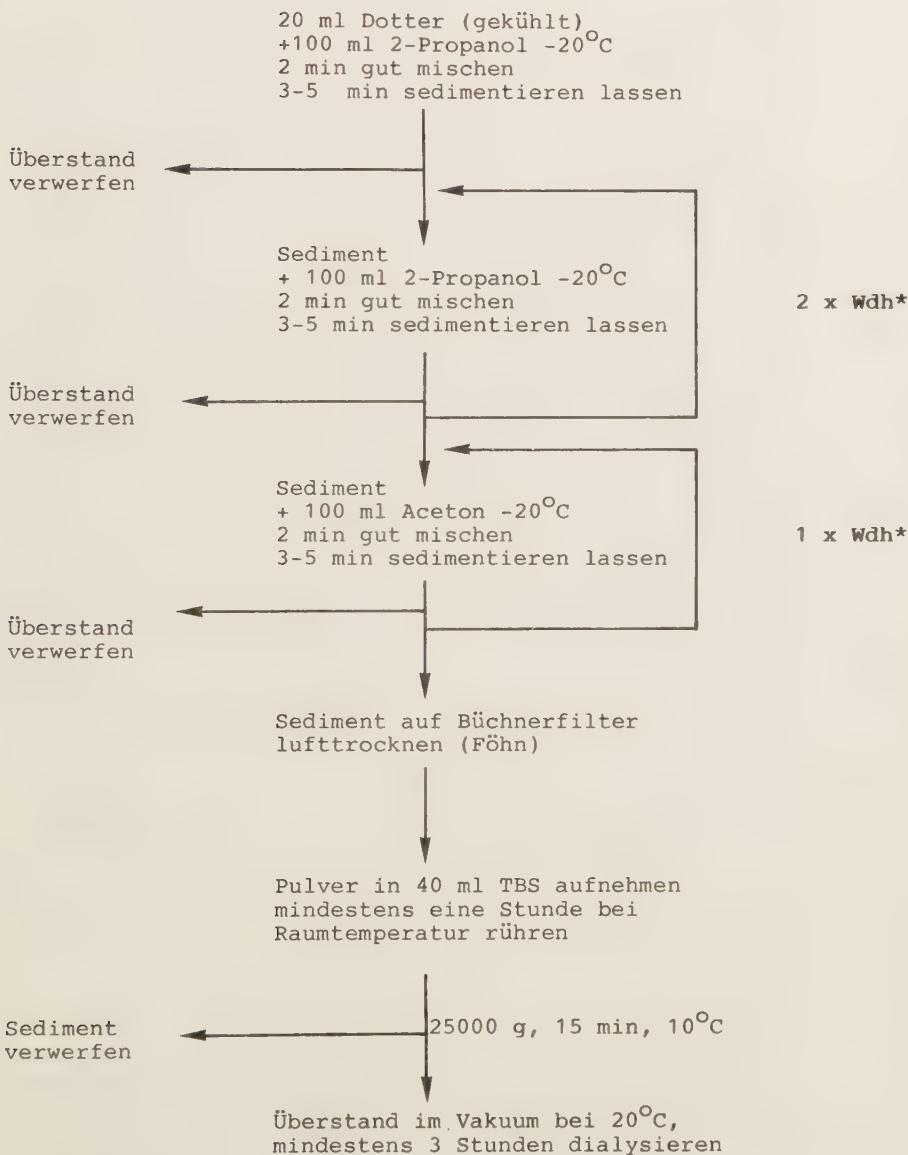
Entweder wurde die entfettete Probe ohne weitere Reinigung verwendet oder sie wurde weitergereinigt, entweder

1. durch Konzentrierung und Anreicherung durch Fällung mit Natriumsulfat (siehe 2.5.1)
- oder
2. mit Anti-Hühner- $\gamma$ -Affinitätschromatographie an Cyanobromid-(CNBr-)aktivierter Sepharose gekoppelt (siehe 2.5.4).

Abb. 5

## 2-Propanol-Aceton Extraktion

(Bade und Stegemann, 1984)



\* Wiederholen

#### 2.5.4 Affinitätschromatographie

##### Antigenkopplung

Zur Herstellung der Anti- $\gamma$ -Affinitätssäule wurde Cyanobromid (CNBr) aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Schweden) verwandt. Zum Quellen wurde die Cyanobromid (CNBr) aktivierte Sepharose 15 Minuten in 1 mM Salzsäure gegeben und auf einen Glasfilter mehrere Male damit gewaschen. Für ein Gramm Pulver wurden etwa 200 ml Salzsäure benötigt. Danach wurde das Gel mit 5 ml Kopplungspuffer (0,1 M Phosphatpuffer mit 0,5 M Natriumchloridlösung, pH 6,6) gewaschen und sofort anschließend die antikörperhaltige Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden im silikonisierten Rundkolben bei Raumtemperatur langsam gedreht.

Danach wurde das Gel in den 0,2 M Glycin-Puffer pH 8,0, gegeben und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch das Glycin wurden die von Anti- $\gamma$  nicht besetzten aktivierten Bindungsstellen abgeblockt. Um die nicht gebundenen Proteine auszuwaschen, wird abwechselnd mit 0,1 M Acetatpuffer pH 4,0 und 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 8,3 gewaschen (beide Puffer enthalten 0,5 M Natriumchlorid). Durch den Wechsel des pH-Wertes soll erreicht werden, daß keine freien Liganden über eine Ionenbindung an der Sepharose haften bleiben. Aufbewahrt wurde das fertige Gel bei 4°C.

##### Durchführung der Affinitätschromatographie:

Das Probenmaterial wurde exzessiv gegen Startpuffer dialysiert.

Das Gel wurde in eine Säule gefüllt und mit Startpuf-

fer äquilibriert (etwa mit dem 20fachen Säulenvolumen). Danach wurde die umdialysierte und bei 10 000g abzentrifugierte Probe mit einer Tropfgeschwindigkeit von 2 bis 3 Tropfen/Minute auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Nachdem die Probe aufgetragen war, wurde die Säule mit Startpuffer gewaschen (ca. mit dem 20fachen Säulenvolumen).

Die Elution des IgG erfolgte mit 0,5 M Ammoniak-Lösung in fünfzehn 2 ml-Portionen. Der Proteingehalt wurde im Photometer bei 280 nm gemessen. Als Leerwert diente der Elutionspuffer. Die proteinhaltigen Proben wurden zusammen gegen TBS dialysiert und in PEG (20 000) konzentriert.

Da im Durchlauf noch IgG-Aktivität nachzuweisen war (Ouchterlony, Elisa), wurde damit eine erneute Affinitätschromatographie durchgeführt. Die dabei erhaltenen proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden ebenfalls gegen TBS dialysiert und mit dem Konzentrat des ersten Säulenlaufes gepoolt.

## 2.6 Hitzestabilitätstest

### 2.6.1 Ei

In die Schale der Eier wurde am stumpfen Pol ein kleines Loch gemacht und mittels einer Einmalspritze mit Kanüle wurden maximal 0,5 ml Dotter entnommen, der 1:20 mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung verdünnt wurde. Danach wurden die Eier in einer Drahtschlinge mit der Öffnung nach oben in siedendes Wasser gehängt und 4, 6, 8 oder 10 Minuten gekocht. Die Eier wurden eine Minute in kaltem Wasser abgekühlt und quer aufgeschlagen. Es

wurde je eine Dotterprobe vom Rand und aus der Mitte gewonnen und ebenfalls 1:20 mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Grobe und feste Dotterbrocken wurden mit dem Spatel zerkleinert. Nach 20minütigem Rühren wurde die Probe über 5 Lagen Gaze (Verbandsmull) abgeseiht. Ein Aliquot wurde bei 4°C gelagert und innerhalb von 48 Stunden quantitativ ausgewertet.

Für eine Kochreihe von 4 bis 10 Minuten wurden die Eier einer Henne mit möglichst gleichem Gewicht und möglichst nahem Legedatum gewählt. Eier, bei denen bei der Entnahme des Vergleichwertes Eiklar angesaugt worden war oder bei denen beim Kochen mehr als ein Eiklarpfropf von 5 mm Durchmesser ausgetreten war, wurden verworfen.

#### 2.6.2 Dotter

Der Dotter eines Eies wurde 1:20 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, in 10 gleiche Portionen geteilt und in Polystyrolreagenzgläsern gefüllt. Eine Probe wurde als Vergleichswert bei 4°C gelagert, von den anderen wurde je eine in einem 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 75 °oder 80°C heißem Schüttelwasserbad für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben im Leitungswasserbad abgekühlt und bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert.

## 2.7 Salzsäuretenazität des Dotters

Das Ei wurde aufgeschlagen, der Dotter grob vom Eiklar getrennt und auf einem Streifen Filterpapier (Schleicher und Schüll) durch vorsichtiges Rollen auf schiefer Ebene vom restlichen Eiklar befreit. Die Dotterhaut wurde angestochen und ihr Inhalt in einer Petrischale aufgefangen, homogen gerührt und 10 ml Dotter 1:20 mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Aus diesem Pool wurden 9 Portionen zu je 20 ml in kleine Bechergläser gefüllt und ein Teil für den Ausgangswert aufgehoben. Nach genauem Zeitplan wurden die pH-Werte mit 10 M Salzsäure auf 4,5; 3,0; 2,0; 1,4; 1,1; 0,9; 0,8; 0,7 und 0,6 eingestellt. Von jedem dieser gesäuerten Pools wurden 3 x 6 ml in Reagenzgläser gefüllt. Nach einer halben, einer und zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen mit Natronlauge auf pH-Werte zwischen 7,0 und 8,0 eingestellt. Die Proben wurden bei 4°C gelagert und innerhalb von 48 Stunden auf IgG- und Antikörperkonzentration untersucht.

Der durch die Säuerung und die Neutralisation entstandene Verdünnungseffekt wurde durch die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (nach Lowry, siehe 2.4.1.2) rechnerisch berücksichtigt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Extraktionsverfahren

Die ausgewählten Extraktionsverfahren wurden bezüglich der Ausbeute an IgG und der verbleibenden Antikörperaktivität, des Reinheitsgrades des Endproduktes und der Aufwendigkeit der Arbeitstechnik untersucht und verglichen.

Die Beschreibung der einzelnen Methoden ist unter 2.5 aufgeführt.

##### 3.1.1 Fettfällung mit Dextransulfat und Kombinationen

Nach der Fettfällung mit Dextransulfat waren in der Lösung noch 73,4% der Ausgangsmenge an IgG zu finden und eine Abnahme der Antikörperaktivität auf 63,1% festzustellen. Den Reinheitsgrad des Produktes zeigte das SDS-Gel (Abb.11,A, S.55).

Der Zeitaufwand bis hierher beträgt mindestens 115 Minuten.

An die Entfettung des Dotters mit Dextransulfat wurden zwei unterschiedliche Schritte zur weiteren Reinigung angeschlossen, entweder

- a) Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat  
oder
- b) Reinigung durch Affinitätschromatographie.

ad a)

Nach der weiteren Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat wurden 64,5% der Ausgangsmenge an IgG und 52,4% der Antikörperaktivität im Endprodukt gefunden. Dieses Reinigungsverfahren dauerte nochmals 100 Minuten. Die Reinheit des Immunglobulins wurde mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen überprüft. Das SDS-Gel (Abb.11,C, S.55) zeigte eine einzige dicke Bande mit dem Molekulargewicht von 170 000 Dalton, das IgG, und wenige dünne Banden. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Abb.10, S.54) gegen polyvalentes Antiserum war nur ein Präzipitat zu sehen.

ad b)

Bei den Affinitätschromatographien, die nur nach Vorreinigungen durchgeführt wurden, waren keine Verluste an Protein zu verzeichnen.

Nach zwei Säulenläufen im Anschluß an die Entfettung mit Dextransulfat waren im Gesamteluat 39,7% IgG und 18,3% Antikörperaktivität von der zum Säulenlauf eingesetzten Menge (10 ml = 1 ml Dotter) zu finden, doch im Durchlauf befanden sich noch knapp 58% IgG und 80% Antikörperaktivität. Nach diesen kombinierten Reinigungsverfahren konnte das IgG sowohl in der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Abb.10, S.54) gegen polyvalentes Antiserum, als auch im SDS-Gel rein dargestellt werden (Abb.11,B, S.55).

### 3.1.2 Entfettung des Dotters mit Propanol/Aceton und Kombinationen

Nach der Entfettung mit Propanol und Aceton wurden 69,5% IgG und eine Antikörper-Aktivität von 68,3% gefunden. Das SDS-Gel (Abb.11,E, S.55) wies mehrere dicke und mehr als zehn dünne Banden auf. In der zweidimensionalen Immunelektrophorese gegen polyvalentes Antiserum waren drei Gipfel zu sehen (Abb.8, S.53) Der Arbeitsaufwand für diese Entfettung betrug ca. eine Stunde und der Gesamtzeitaufwand bis zum Erhalt des endgültigen Produktes insgesamt 7 Stunden.

An die Entfettung des Dotters mit Propanol und Aceton (Bade und Stegemann, 1984) wurden zwei unterschiedliche Schritte zur weiteren Reinigung angeschlossen, entweder

- a) Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat  
oder
- b) Reinigung durch Affinitätschromatographie.

ad a)

Die im Anschluß an die Entfettung durchgeführte Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat ergab ein Endprodukt, daß 53,4 % der Ausgangs-IgG-Menge und 41,8 % der Antikörperaktivität enthielt. Im SDS-Gel (Abb.11,G, S.55) zeigte die Endsubstanz mehrere Banden, davon zwei deutlich. Diese beiden Proteinfractionen waren auch in der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Abb.9, S.53) gegen polyvalentes Antiserum zu sehen.

ad b)

Nach den Säulenläufen im Anschluß an die Fettextraktion mit Propanol/Aceton waren im Eluat 13,0% IgG und 13,9% Antikörperaktivität der für den Säulenlauf eingesetzten Menge (5 ml = 1 ml Dotter) zu finden, die restliche Proteinmenge befand sich nahezu vollständig im Durchlauf.

IgG konnte mit dieser kombinierten Reinigungsmethode als Reinprodukt isoliert werden (Abb.10, S.54; Abb.11,F, S.55). Die Größe der Ausbeute an IgG und Antikörpern hängt also von der Anzahl der durchgeführten Säulenläufe und von der Kapazität der Säule ab.

### 3.1.3 Reinigung des Dotter-IgG mit Polyäthylenglykol

Nach der Reinigung und Konzentrierung mit Polyäthylenglykol (PEG 6000, Polson et al., 1985) wurden im Endprodukt 44,4% IgG und 40,9% Antikörperaktivität gefunden. Im SDS-Gel (Abb.11,D, S.55) unterschied sich das Bild kaum von dem der Kombination aus Dextransulfat und Natriumsulfat (Jensenius et al., 1981). Auch in der zweidimensionalen Immunelektrophorese gegen polyvalentes Antiserum war nur ein Gipfel zu sehen (Abb.10, S.54). Der Zeitaufwand betrug etwa drei Stunden.

Als Vergleich zu den erhaltenen gereinigten Produkten wurde sowohl Hühnerserum (Abb.6, S.52) als auch Eidotter (Abb.6, S.52) in der Zweidimensionalen Immunelektrophorese aufgetrennt dargestellt.

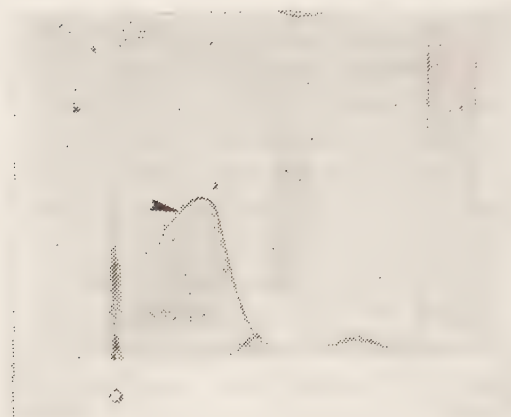


Abb.6

Antigen: 4  $\mu$ l Serum  
(1:2 verdünnt mit PBS)  
immunisierten Hühner.

▲ = IgG

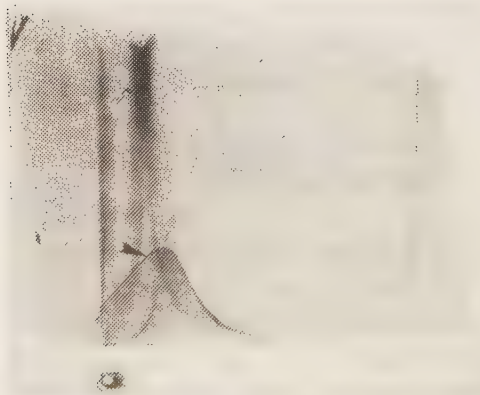


Abb.7

Antigen: 4  $\mu$ l Dotter  
(1:4 verdünnt mit PBS)

▲ = IgG

Zweidimensionale Immunelektrophorese nach Laurell (1965)  
auf 10 x 10 cm Glasplatten (siehe 2.3.2);

1.Dimension: 10 V/cm, 1% Agarose C, Tris-Barbiturat-  
Puffer pH 8,6; Anode rechts.

2. Dimension: 1V/cm, Anode oben.

Antiserum: 61  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> Anti-Hühnerserum polyspezifisch.  
(Laufbedingungen und Material für Abb. 6 bis 11)

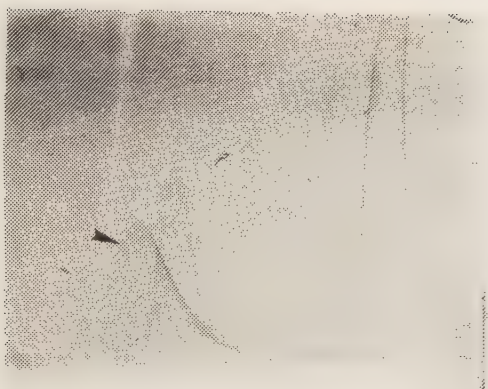


Abb.8 Antigen: 4  $\mu$ l Produkt nach Entfettung durch Propanol/Aceton  
(1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.3)  $\blacktriangle$  = IgG



Abb.9 Antigen: 4  $\mu$ l Produkt nach Entfettung mit Propanol/Aceton und anschließender  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentrierung  $\blacktriangle$  = IgG  
(1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.3.1)



Abb.10 Antigen: 4 µl Produkt nach Dextransulfatfällung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentrierung (1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.1.1). ▲ = IgG

Gleiches Erscheinungsbild (daher nicht abgebildet) zeigten:

- 4 µl Produkt nach Fettfällung mit Dextransulfat und anschließender Reinigung durch affinitätschromatographischen Säulenlauf (1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.1.2)
- 4 µl Produkt nach Reinigung mit Polyäthylenglykol (1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.2)
- 4 µl Produkt nach Entfettung mit Propanol/Aceton und anschließender Reinigung durch affinitätschromatographischen Säulenlauf (1:4 verdünnt mit PBS) (siehe 2.5.3.2)



Abb.11

SDS-Polyacrylamidgel zur vergleichenden Darstellung der Reinheitsgrade der Produkte, die mit den unter 2.5 beschriebenen Verfahren zur Reinigung und Konzentrierung der Dotterimmunglobuline gewonnenen wurden.

3 - 15 % iges Gradientengel (siehe 2.3.3)

- M = 5 µl hochmolekulares Markergemisch (siehe S.30)
- Do = 40 µl Dotter (1:5 verdünnt mit PBS)
- A = 40 µl Produkt nach Dextransulfatfällung (1:5 verdünnt)
- B = 40 µl Produkt nach Fettfällung mit Dextransulfat und anschließendem affinitätschromatographischem Säulenlauf (1:5 verdünnt)
- C = 40 µl Produkt nach Fettfällung mit Dextransulfat und anschließender  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentrierung (1:5 verdünnt)
- D = 40 µl Produkt nach Reinigung mit Polyäthylenglykol (1:5 verdünnt)
- E = 40 µl Produkt nach Entfettung mit Propanol/Aceton (1:5 verdünnt)
- F = 40 µl Produkt nach Entfettung mit Propanol/Aceton mit anschließendem affinitätschromatographischen Säulenlauf (1:5 verdünnt)
- G = 10 µl Produkt nach Entfettung mit Propanol/Aceton und anschließender  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Konzentrierung (1:5 verdünnt)

### 3.2 Vergleich der IgG- und Antikörperkonzentration in Dotter und Serum

Der Vergleich der im Serum und Dotter gemessenen IgG-Durchschnittswerte zeigte, daß die Dotterkonzentrationen durchweg höher lagen als die des Serums (Abb.12, S.57). Jedoch am 7. und 35. Tag, also sieben Tage nach dem Boostern, lagen die Werte des Serum-IgGs höher als die des Dotters. Die Durchschnittswerte des Serum-IgGs (Tab.1, S.67) bewegten sich im Bereich von  $6,1 \text{ mg/ml} \pm 2,1 \text{ mg}$  bis  $10,3 \text{ mg/ml} \pm 3,7 \text{ mg}$ ; die des Dotter-IgG im Bereich von  $6,3 \text{ mg/ml} \pm 1,9 \text{ mg}$  bis  $9,8 \text{ mg/ml} \pm 2,3 \text{ mg}$ .

Die durchschnittlichen HSA-Antikörpertiter (Abb.13, S.58; Tab.2, S.68) von Serum und Dotter lagen eng zusammen, außer am 7. und am 35. Tag. Sowohl das Serum, als auch der Dotter wiesen einen Präimmuntiter auf, der bei Titer 5,5 lag. Am siebten Tag hatten die Serumantikörper einen Titer von 14,50, der Titer des Dotters lag bei 7,54. Am 35. Tag, sieben Tage nach dem Boostern, lag der Serumantikörperspiegel bei Titer 15,67 und der des Dotters bei Titer 13,13. Ab dem 42. Tag wiesen die Titer nahezu identische, langsam sinkende Werte auf. Die Serumdurchschnittstiter der HSA-Antikörper lagen ab dem 7. Tag zwischen Titer 12,75 und Titer 16,21. Die Dotterdurchschnittstiter der HSA-Antikörper lagen ab dem 14. Tag zwischen Titer 12,94 und Titer 15,80.

Ein Huhn wies erheblich niedrigere IgG-Werte sowohl in Serum ( $1,2 \text{ mg/ml}$  bis  $3,2 \text{ mg/ml}$ ) als auch im Dotter ( $2,1 \text{ mg/ml}$  bis  $4,6 \text{ mg/ml}$ ) auf. Die Antikörpertiter in Serum und Dotter entsprachen denen der jeweiligen Mittelwerte (Tab.2, S.68).

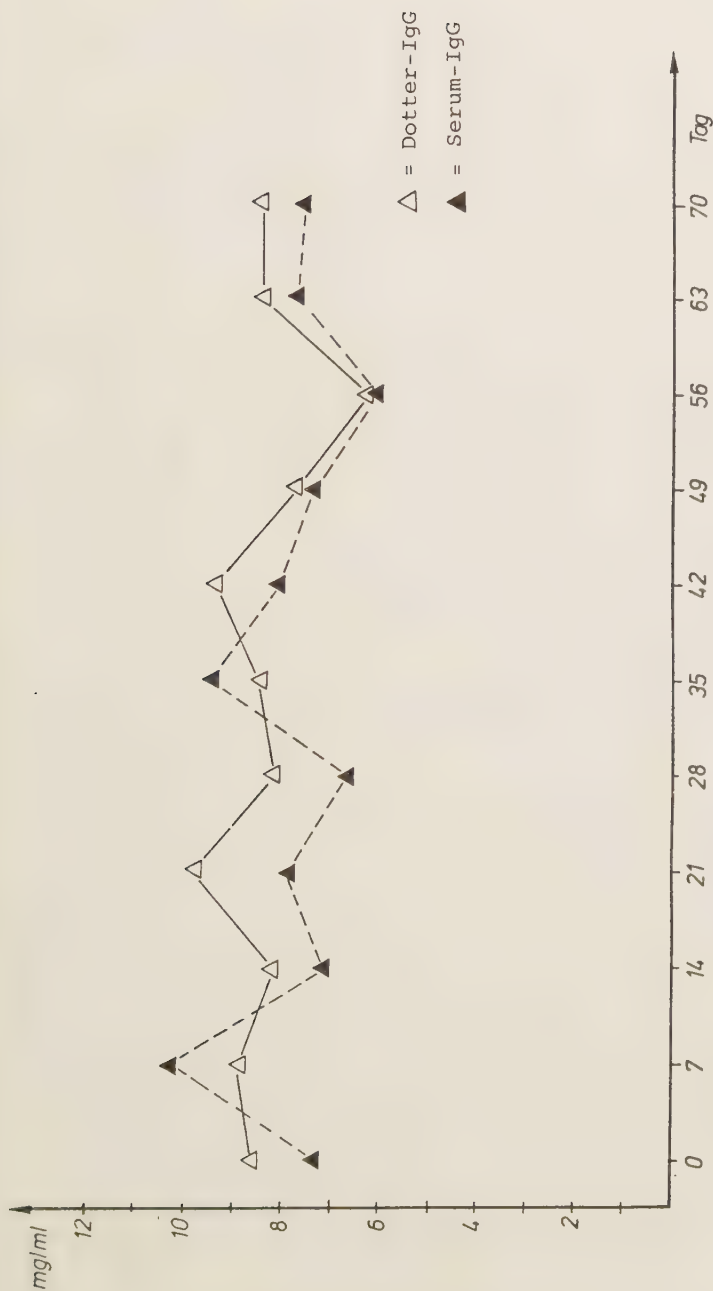


Abb.12

IgG-Konzentrationen in Serum und Dotter vergleichend

Vergleich der IgG-Konzentrationen in Serum und Dotter vom 0. Tag bis zum 70. Tag

nach der Immunisierung. 0. Tag: Immunisierung mit HSA und FcA;

28. Tag Boosterung mit HSA.

(n = 9; SD siehe Tab. 1, S. 67)



Abb. 13

Antikörperkonzentrationen im Serum und Dotter vergleichend

Vergleich der HSA-Antikörper-Konzentrationen in Serum und Dotter vom 0. Tag

bis zum 70. Tag nach der Immunisierung. 0. Tag: Immunisierung mit HSA und FCA;

28. Tag Boosterung mit HSA.

(n = 9; SD siehe Tab. 2, S. 68)

### 3.3 Salzsäuretenazität des Dotter-IgG

Die Auswirkungen von unterschiedlichen Salzsäurekonzentrationen nach einer halben Stunde, einer Stunde und zwei Stunden Einwirkung auf die IgG-Konzentration und auf den Antikörpergehalt im 1:20 verdünnten Dotter wurden untersucht (Abb.14,15, S.60/61; Tab.3/4, S.69/70).

Bei den pH-Werten 4,5 und 3,0 war nur eine Abnahme der IgG-Konzentration von maximal 10% festzustellen, die abhängig von der Einwirkungszeit der Salzsäure zunahm, außer bei dem Wert von pH 4,5 nach zwei Stunden Einwirkungszeit, der nicht weiter abnahm.

Ab pH-Wert 2,0 war eine deutliche Abhängigkeit der IgG-Konzentration von pH-Wert und Einwirkungszeit festzustellen. Der Halbstundenwert von pH 1,4 lag bei 81%, damit war er zwar um 4% höher als der Vergleichswert von pH 2,0, dennoch war auch hier die Abnahme der IgG-Konzentration deutlich von der Einwirkungszeit abhängig.

Ab pH 1,1 und zweistündigem Einwirken der Salzsäure war die 50% Marke unterschritten. Die Werte von pH 0,7 und 0,6 lagen unter 20% und sanken bei pH 0,6/2h auf 2,8% herab.

Die gegen HSA gerichteten Antikörper zeigten schon ab pH 4,5 einen Aktivitätsverlust, der abhängig von zunehmender Einwirkungszeit und Säurestärke war. Die Abnahme war aber deutlicher ausgeprägt als beim Gesamt-IgG. Die Antikörperaktivität war schon bei pH 3,0/2h um 50% gesunken und hatte ab pH 1,4/2h weniger als 10% Restaktivität. Bei pH 0,6/2h lag der Wert bei 0,4%.

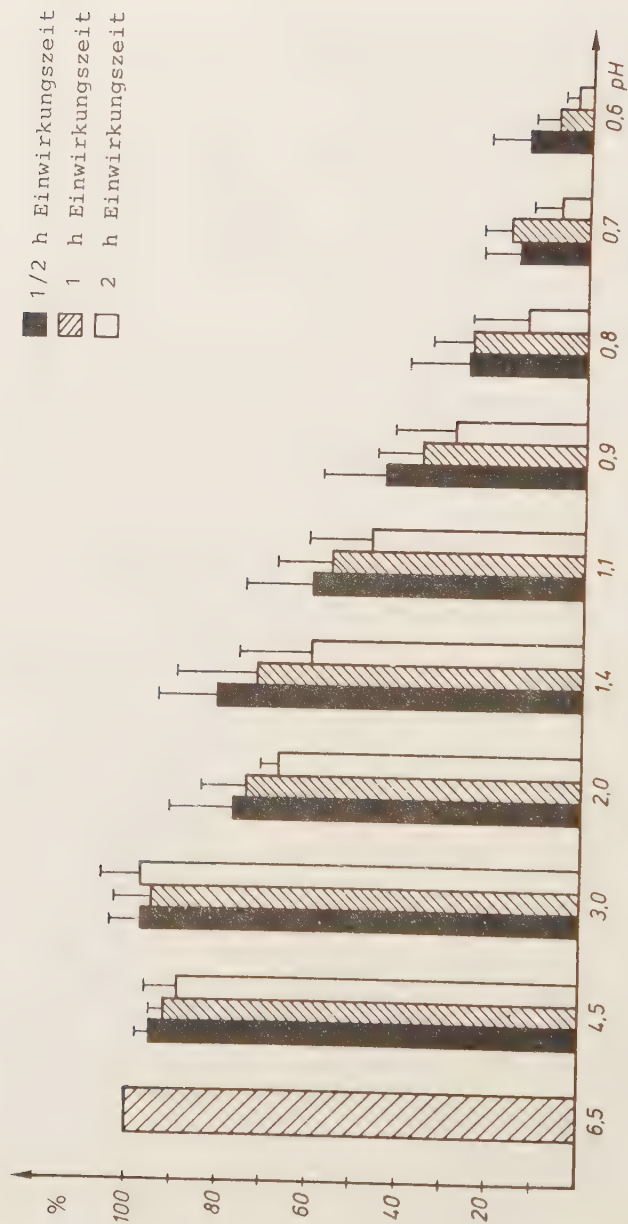


Abb. 14

Salzsäuretenazität des Dotter-IgG

Verbleibende Konzentration des Dotter-IgG nach 1/2, 1 und 2 Stunden Einwirkungszeit von verschiedenen Salzsäurekonzentrationen auf den 1:20 verdünnten Dotter (0,9%ige NaCl-Lösung); n = 6

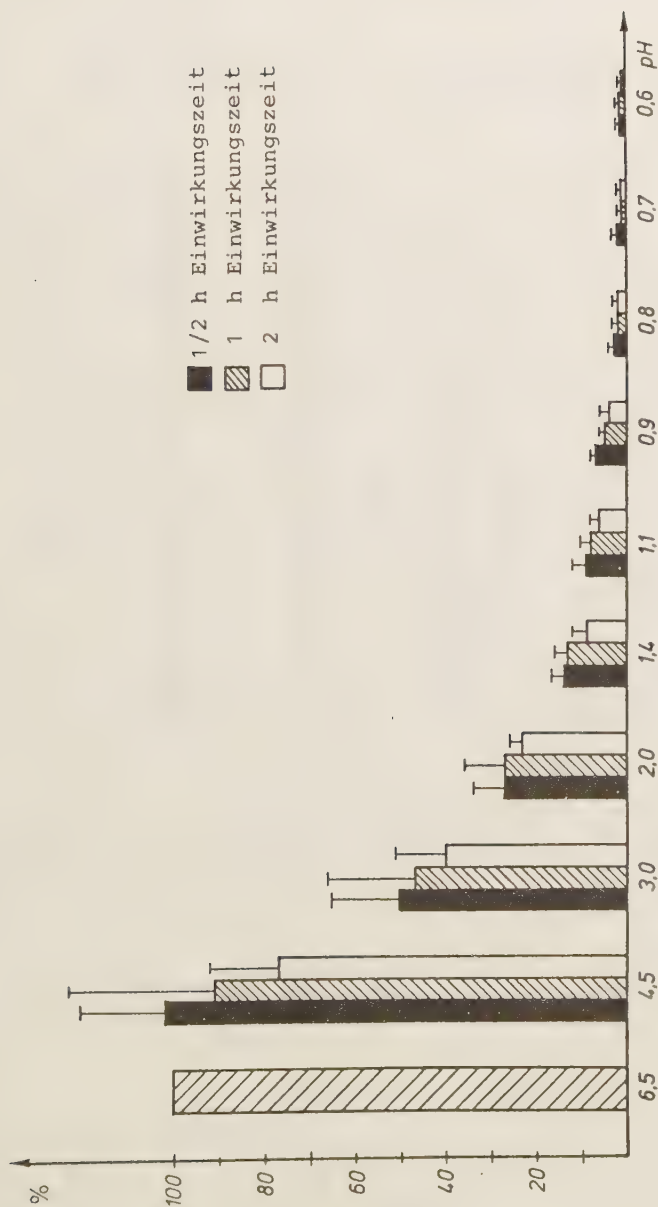


Abb.15

Salzsäuretenazität der Dotterantikörper

Verbleibende Anti-HSA-Aktivität der Dotterantikörper nach 1/2, 1 und 2 Stunden Einwirkungszeit von verschiedenen Salzsäurekonzentrationen auf den 1:20 verdünnten Dotter (0,9%ige NaCl-Lösung); n = 6

### 3.4 Hitzeresistenz des Dotter-IgG

#### 3.4.1 Hitzeresistenz des Dotter-IgG im gekochten Ei

Der Dotter war im Zentrum nach 4, 6 und 8 Minuten Kochzeit noch flüssig, während der Rand sich von außen nach innen verfestigte; deshalb wurden pro Dotter jeweils eine Probe vom Rand und eine aus der Mitte untersucht (Abb.16, S.63; Tab.5, S.71).

Es zeigte sich, daß der IgG-Gehalt der Dottermitte nach 4 und 6 Minuten noch nahezu unverändert war und erst nach 8 Minuten Kochzeit auf 66% absank und nach 10 Minuten um 8% lag. Die Proben vom Dotterrand hingegen zeigten bei 4 Minuten noch keine Abnahme, nach 6 Minuten eine auf ca 46%, nach 8 Minuten auf knapp über 20% und nach 10 Minuten auf 0%.

Die Antikörperaktivität (Abb.17, S.64; Tab.5, S.71) nahm beim Vier-Minuten-Ei sowohl am Rand als auch in der Mitte auf 73% bzw. 80% ab. Nach 6 Minuten Kochzeit war in der Mitte keine weitere Abnahme feststellbar, jedoch am Rand lag die Restaktivität unter 30%. Nach 8 Minuten war in der Mitte 47% Antikörperaktivität zu finden, die nach 10 Minuten auf 4% absank, während sie im Randdotter nach 8 Minuten auf 9,2% absank und nach 10 Minuten den Nullwert erreicht hatte.

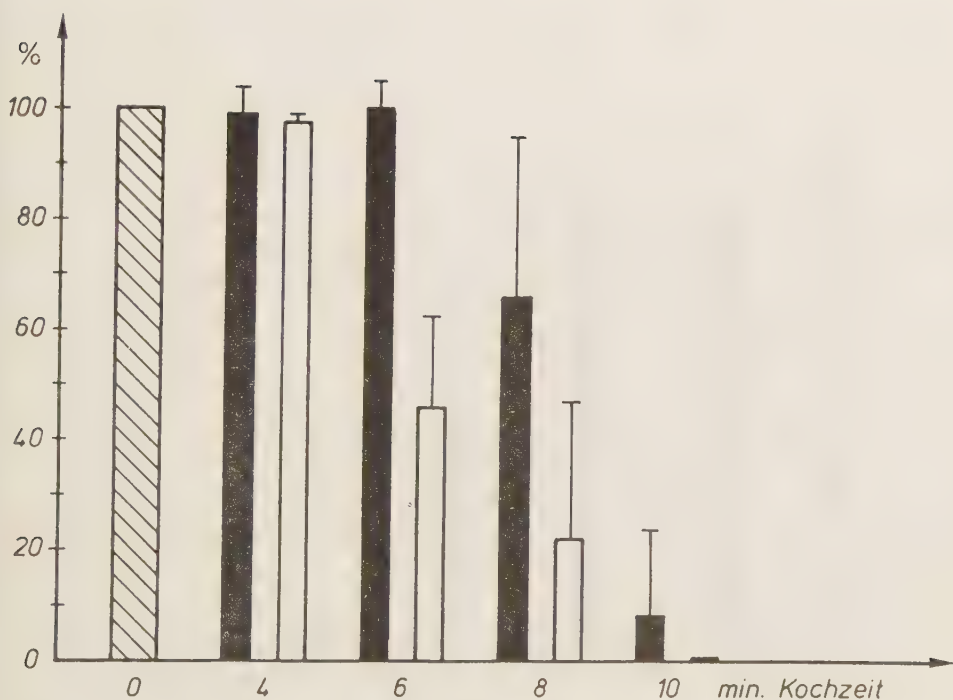


Abb.16

Hitzeresistenz des Dotter-IgG im ganzen Ei

IgG-Konzentration nach 4, 6, 8, 10minütigem Kochen des Gesamteies

- ▨ = vor dem Kochen entnommene Vergleichsprobe
- = Probe aus der Mitte des Dotters
- = Probe vom Rand des Dotters

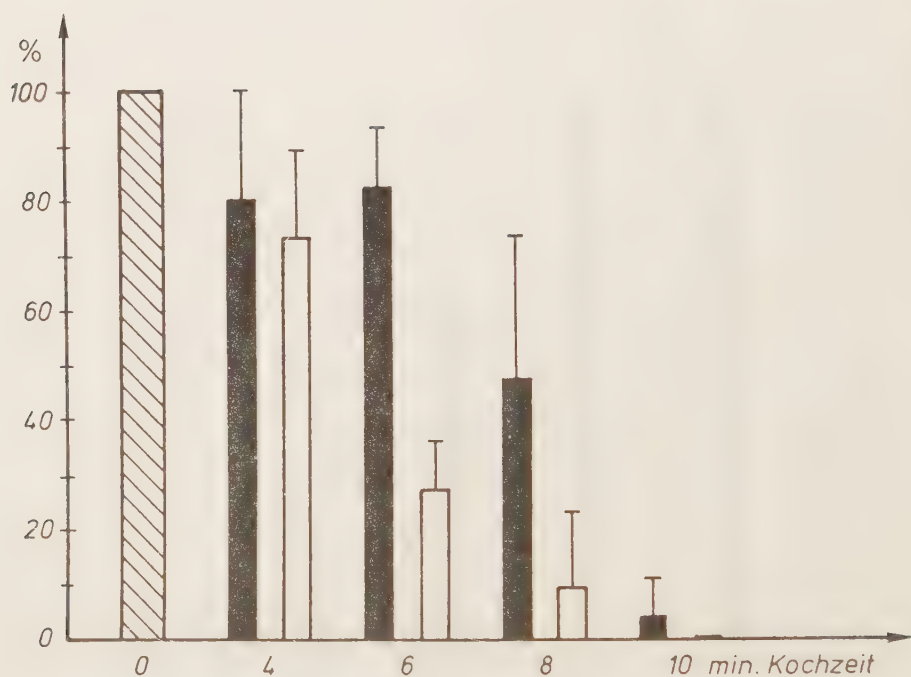


Abb.17

Hitzeresistenz der Dotter-Antikörper im ganzen Ei

Antikörper-Konzentration nach 4, 6, 8, 10minütigem Kochen  
des Gesamteies

-  = vor dem Kochen entnommene Vergleichsprobe
-  = Probe aus der Mitte des Dotters
-  = Probe vom Rand des Dotters

### 3.4.2 Hitzeresistenz des Dotter-IgG im verdünnten Dotter

Als Ergänzung zu diesen Kochversuchen sind die Ergebnisse der verdünnten Dotter im unterschiedlich heißen Wasserbad zu sehen (Tab.6, S.72).

In Abb.18 (S.66) sind die Wasserbadtemperaturen angegeben, die des Eidotters selbst lagen maximal um  $1^{\circ}\text{C}$  bis  $1,5^{\circ}\text{C}$  niedriger. Bis zur Wasserbadtemperatur von  $65^{\circ}\text{C}$  blieb die IgG-Konzentration im Dotter unverändert, erst ab dieser Temperatur traten Veränderungen auf. Bei einer Wassertemperatur von  $70^{\circ}\text{C}$ , also  $68,5^{\circ}$  bis  $69^{\circ}\text{C}$  Kerntemperatur, waren knapp 80% IgG zu finden, bei  $75^{\circ}\text{C}$  nur noch 6,0% und bei  $80^{\circ}\text{C}$  war kein IgG mehr zu finden. Die Antikörper zeigten bis  $50^{\circ}\text{C}$  eine 2-5%ige Aktivitätssteigerung. Die Aktivität sank im Temperaturbereich von  $55^{\circ}\text{C}$  bis  $65^{\circ}\text{C}$  auf 82% bis 94% der Ausgangsmenge. Bei  $70^{\circ}\text{C}$  sank der Wert auf 54% ab und nahm bei  $75^{\circ}\text{C}$  sprunghaft auf 1,6% ab.

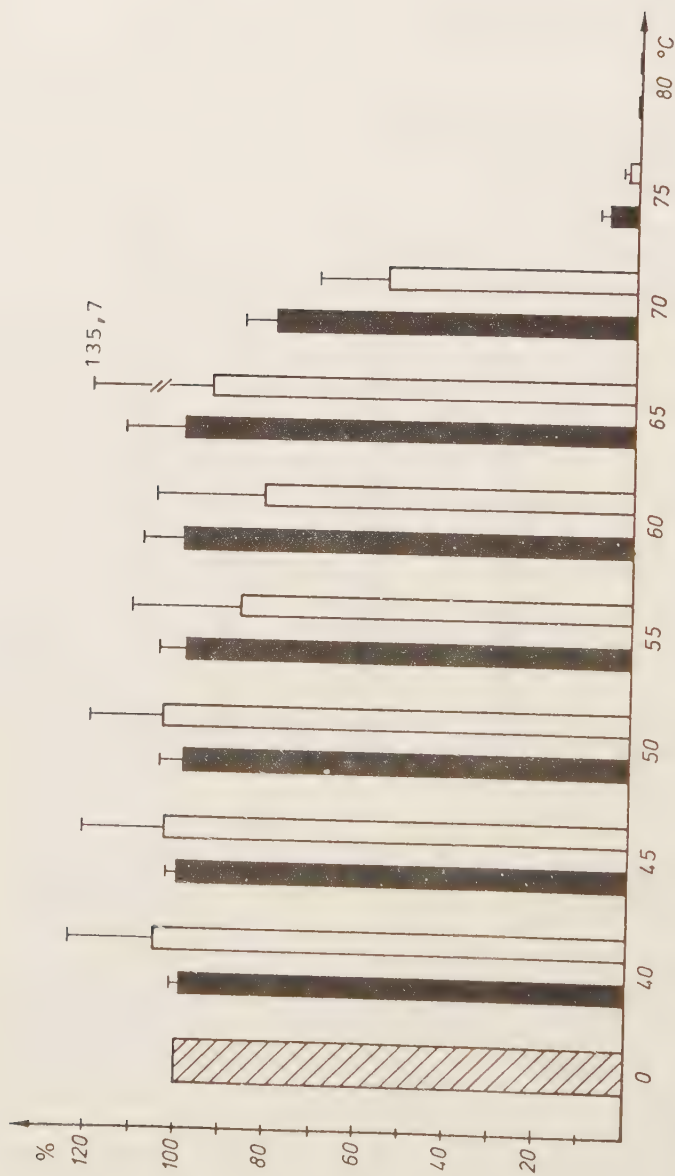


Abb. 18

IgG- und Antikörperkonzentration nach dem Erhitzen des verdünnten Dotters im Wasserbad.

-  = unehitzte Vergleichsprobe
-  (IgG- und Antikörper-Konzentration)
-  = IgG-Konzentration
-  = HSA-Antikörper-Konzentration

### 3.5 Tabellarischer Anhang der Ergebnisse

| Tag | Serum     |          | Dotter    |          |
|-----|-----------|----------|-----------|----------|
|     | mg/ml     | mg/ml    | mg/ml     | mg/ml    |
|     | $\bar{X}$ | $\pm$ SD | $\bar{X}$ | $\pm$ SD |
| 0.  | 7,3       | 2,6      | 8,6       | 2,6      |
| 7.  | 10,3      | 3,7      | 8,9       | 2,9      |
| 14. | 7,2       | 2,2      | 8,2       | 1,8      |
| 21. | 7,9       | 2,9      | 9,8       | 2,3      |
| 28. | 6,7       | 2,5      | 8,2       | 2,5      |
| 35. | 9,5       | 2,6      | 8,5       | 2,5      |
| 42. | 8,1       | 2,9      | 9,4       | 2,7      |
| 49. | 7,4       | 2,7      | 7,8       | 2,0      |
| 56. | 6,1       | 2,1      | 6,3       | 1,9      |
| 63. | 7,8       | 2,6      | 8,5       | 1,8      |
| 70. | 7,6       | 2,5      | 8,5       | 2,6      |

Tab.1

#### Vergleich der IgG-Durchschnittswerte

Vergleich der Durchschnittswerte der IgG-Konzentrationen in Serum und Dotter. 0. Tag mit HSA und FCA immunisiert und am 28. Tag mit HSA geboostert.

n = 9

| Tag | Serum     |          | Dotter    |          |
|-----|-----------|----------|-----------|----------|
|     | Titer     | %        | Titer     | %        |
|     | $\bar{X}$ | $\pm$ SD | $\bar{X}$ | $\pm$ SD |
| 0.  | 5,46      | 102,1    | 5,50      | 48,7     |
| 7.  | 14,50     | 35,5     | 7,54      | 83,6     |
| 14. | 13,46     | 57,0     | 13,96     | 66,2     |
| 21. | 12,75     | 48,6     | 12,94     | 45,3     |
| 28. | 13,69     | 49,7     | 13,69     | 62,2     |
| 35. | 15,67     | 49,6     | 13,13     | 70,6     |
| 42. | 16,21     | 68,1     | 15,80     | 55,2     |
| 49. | 15,60     | 50,9     | 15,52     | 59,6     |
| 56. | 14,90     | 52,5     | 15,00     | 55,2     |
| 63. | 14,83     | 51,5     | 14,71     | 52,7     |
| 70. | 14,65     | 37,3     | 14,61     | 51,4     |

Tab.2

Vergleich der durchschnittlichen HSA-Antikörperwerte

Vergleich der Durchschnittswerte der HSA-Antikörperkonzentrationen in Serum und Dotter. 0. Tag mit HSA und FCA immunisiert und am 28. Tag mit HSA geboostert.  
n = 9

| Einwirkungs-<br>zeit | 1/2 Stunde |          | 1 Stunde  |          | 2 Stunden |          |
|----------------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
|                      | $\bar{X}$  | $\pm SD$ | $\bar{X}$ | $\pm SD$ | $\bar{X}$ | $\pm SD$ |
| pH-Wert              |            |          |           |          |           |          |
| 6,5                  | 100,0      | 0,0      | 100,0     | 0,0      | 100,0     | 0,0      |
| 4,5                  | 95,2       | 3,1      | 92,1      | 3,3      | 89,0      | 6,5      |
| 3,0                  | 96,8       | 6,9      | 94,7      | 8,4      | 96,8      | 8,5      |
| 2,0                  | 77,3       | 13,9     | 73,4      | 9,5      | 67,1      | 4,3      |
| 1,4                  | 81,0       | 13,4     | 71,9      | 17,5     | 60,1      | 15,6     |
| 1,1                  | 60,4       | 15,4     | 55,7      | 12,2     | 47,2      | 13,6     |
| 0,9                  | 43,6       | 14,3     | 36,3      | 10,2     | 28,7      | 13,2     |
| 0,8                  | 26,2       | 13,3     | 24,5      | 9,0      | 12,7      | 11,9     |
| 0,7                  | 14,5       | 8,2      | 16,6      | 5,5      | 6,0       | 5,6      |
| 0,6                  | 12,6       | 9,4      | 7,1       | 5,3      | 2,8       | 3,2      |

Tab. 3

Salzsäuretenazität des Dotter-IgG

Verbleibende Konzentration des Dotter-IgG nach 1/2, 1 und 2 Stunden Einwirkungszeit von verschiedenen Salzsäurekonzentrationen auf den 1:20 verdünnten Dotter;

n = 6

| Einwirkungs-<br>zeit | 1/2 Stunde |          | 1 Stunde  |          | 2 Stunden |          |
|----------------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
|                      | $\bar{X}$  | $\pm SD$ | $\bar{X}$ | $\pm SD$ | $\bar{X}$ | $\pm SD$ |
| pH-Wert              |            |          |           |          |           |          |
| 6,5                  | 100,0      | 0,0      | 100,0     | 0,0      | 100,0     | 0,0      |
| 4,5                  | 102,0      | 18,4     | 91,0      | 32,0     | 77,3      | 15,3     |
| 3,0                  | 50,1       | 14,2     | 47,6      | 18,5     | 40,0      | 10,9     |
| 2,0                  | 26,9       | 7,4      | 27,0      | 8,9      | 22,6      | 3,1      |
| 1,4                  | 14,1       | 3,3      | 13,3      | 3,4      | 9,0       | 3,4      |
| 1,1                  | 9,4        | 2,9      | 8,0       | 1,9      | 6,0       | 2,0      |
| 0,9                  | 6,6        | 1,4      | 5,2       | 1,3      | 3,7       | 1,7      |
| 0,8                  | 2,4        | 0,5      | 2,3       | 1,4      | 1,9       | 0,9      |
| 0,7                  | 2,0        | 0,9      | 1,4       | 0,6      | 1,0       | 0,8      |
| 0,6                  | 1,1        | 0,8      | 1,3       | 0,9      | 0,4       | 0,4      |

Tab. 4

Salzsäuretenazität der Dotterantikörper

Verbleibende Anti-HSA-Aktivität der Dotterantikörper nach 1/2, 1 und 2 Stunden Einwirkungszeit von verschiedenen Salzsäurekonzentrationen auf den 1:20 verdünnten Dotter; n = 6

| Minuten |                  | IgG            |          | HSA-Anti-<br>körper |          |
|---------|------------------|----------------|----------|---------------------|----------|
|         |                  | %<br>$\bar{X}$ | $\pm$ SD | %<br>$\bar{X}$      | $\pm$ SD |
| 0'      | 0/0 <sup>1</sup> | 100,0          | 0,0      | 100,0               | 0,0      |
| 4'      | M                | 99,2           | 5,4      | 79,9                | 20,4     |
|         | R                | 97,1           | 2,3      | 73,3                | 16,0     |
| 6'      | M                | 100,2          | 4,6      | 82,1                | 11,1     |
|         | R                | 46,3           | 16,3     | 27,4                | 9,1      |
| 8'      | M                | 66,2           | 29,2     | 47,1                | 26,3     |
|         | R                | 22,2           | 25,1     | 9,2                 | 13,7     |
| 10'     | M                | 7,9            | 15,7     | 3,8                 | 6,7      |
|         | R                | 0,0            | 0,0      | 0,0                 | 0,0      |

Tab. 5

Hitzeresistenz des Dotter-IgG im gekochten Ei

IgG- und Antikörperkonzentration nach 4, 6, 8 und 10minütigem Kochen des Gesamteies

<sup>1</sup> = vor dem Kochen entnommene Vergleichsprobe

M = Probe aus der Mitte des Dotters

R = Probe vom Rand des Dotters

n = 6 Kochreihen zu je 4 Eiern

| Wasser-<br>bad<br>°C | IgG<br>% | +SD<br>% | HSA-Anti-<br>körper<br>% | +SD<br>% |
|----------------------|----------|----------|--------------------------|----------|
| 0/0 <sup>1</sup>     | 100,0    | 0,0      | 100,0                    | 0,0      |
| 40°                  | 99,2     | 2,0      | 105,5                    | 19,3     |
| 45°                  | 100,2    | 1,8      | 102,8                    | 18,2     |
| 50°                  | 99,2     | 5,1      | 103,5                    | 15,6     |
| 55°                  | 99,4     | 6,2      | 86,5                     | 24,2     |
| 60°                  | 100,4    | 8,5      | 82,4                     | 24,4     |
| 65°                  | 99,9     | 13,0     | 94,3                     | 41,4     |
| 70°                  | 79,6     | 7,4      | 54,6                     | 15,0     |
| 75°                  | 6,0      | 2,2      | 1,6                      | 0,7      |
| 80°                  | 0,0      | 0,0      | 0,0                      | 0,0      |

Tab. 6

Hitzeresistenz des Dotter-IgG im verdünnten Dotter

IgG- und Antikörperkonzentration nach dem Erhitzen des verdünnten Dotters (1:20 mit 0,9%iger NaCl) im Wasserbad

<sup>1</sup> = nicht erhitzte Vergleichsprobe

n = 6 Eier

## 4. Diskussion

### 4.1 Vergleichende Betrachtung der IgG-Reinigungsverfahren

Dotterantikörper werden immer häufiger in der Diagnostik eingesetzt. Dazu ist es notwendig, den Dotter in eine leicht verdünnbare, homogene Form zu überführen. Diese Lösung sollte nicht nur einfach, sondern auch in größerer Menge herzustellen sein, damit auch große Versuchsreihen mit ein und derselben Antikörperlösung durchgeführt werden können. Die in dieser Arbeit untersuchten Reinigungsverfahren entsprechen dieser Voraussetzung. Eine Versuchsreihe wurde, von einem Dotterpool ausgehend, durchgeführt, so daß für alle Verfahren bezüglich der Dotterinhaltsstoffe die gleichen Voraussetzungen gegeben waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Methoden zur Reinigung und Konzentrierung miteinander verglichen. Um einem babylonischen Sprachgewirr zu entgehen, wurden die Methoden bzw. die verwendeten Kombinationen wie folgt mit den Buchstaben von A - E versehen.

'A' = Fettfällung mit Dextransulfat

'B' = Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat  
(A & B = Jensenius et al., 1981)

'C' = Affinitätschromatographischer Säulenlauf

'D' = Entfettung mit Propanol/Aceton (Bade und Stegemann, 1984)

'E' = Reinigung und Konzentrierung mit Polyäthylenglykol  
(PEG, Polson et al., 1985)

#### 4.1.1 Vergleich der Fettfällung mit Dextransulfat ('A') und der Entfettung mit Propanol/Aceton ('D').

Im entfetteten Produkt der Methode 'A' fand sich um ca. 4% mehr IgG als in dem der Methode 'D'. Jedoch lag die Antikörperkonzentration nach 'A' um 5% niedriger als nach 'D'.

Ausbeute in Prozent nach dem Entfetten des Dotters mit:

|                       | IgG % | Antikörper % |
|-----------------------|-------|--------------|
| 'A' (Dextransulfat)   | 73,7  | 63,1         |
| 'D' (Propanol/Aceton) | 69,5  | 68,3         |

Das Produkt nach 'A' wies eine erheblich größere Reinheit auf als das nach Methode 'D' erhaltene. Die Arbeitszeit der Methode 'A' war mit ca. 115 Minuten anzusetzen. Das Dialysieren wurde über Nacht (12 bis 24 Stunden) durchgeführt. Bei der Methode 'D' wurden nur ca. 60 Minuten Arbeitszeit benötigt, jedoch dauerte es insgesamt 7 Stunden bis das Endprodukt fertig war. Davon wurden ca. 3 Stunden für Dialysieren im Vakuum benötigt, bis das Endprodukt den gut wahrnehmbaren Acetongeruch verloren hatte.

#### 4.1.2 Vergleich der Kombination der Fettfällung mit Dextransulfat ('A') bzw. der Entfettung mit Propanol/Aceton ('D') mit der Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat ('B').

Durch beide Kombinationen 'A' & 'B' bzw. 'D' & 'B' wurde das in den Ausgangsprodukten enthaltene IgG weiter gereinigt und konzentriert. Jedoch wies die Methodenkom-

bination 'A' & 'B' im Endprodukt 11% mehr Gehalt an IgG und an Antikörpern auf, als die Methodenkombination 'D' & 'B'.

Ausbeute in Prozent nach den Methodenkombinationen 'A' & 'B' (Fettfällung mit Dextransulfat und Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat) bzw 'D' & 'B' (Entfettung mit Propanol/Aceton und Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat):

|                                                               | IgG % | Antikörper % |
|---------------------------------------------------------------|-------|--------------|
| 'A' & 'B' (Dextransulfat<br>plus $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )   | 64,5  | 52,4         |
| 'D' & 'B' (Propanol/Aceton<br>plus $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) | 53,4  | 41,8         |

Obwohl beide Produkte nach 'A' und 'D' dem gleichen Reinigungs- und Konzentrierungsschritt ('B') unterzogen wurden, traten bei dem mit Methode 'D' vorbehandelten Endprodukt 5% mehr Verluste an IgG und Antikörpern auf. Darüber hinaus wies dieses neue Produkt einen geringeren Reinheitsgrad auf, als das durch die Kombination der Methoden 'A' und 'B' entstandene. Die geringere prozentuale Ausbeute ist auf die größere Unreinheit der Ausgangssubstanz zurückzuführen.

#### 4.1.3 Kombination der Fettfällung mit Dextransulfat ('A') bzw. der Entfettung mit Propanol/Aceton ('B') mit affinitätschromatographischen Säulenläufen ('C')

Sowohl an Methode 'A' (Entfettung mit Dextransulfat) als auch an 'D' (Entfettung mit Propanol/Aceton) wurden affinitätschromatographische Säulenläufe ('C') angeschlossen. Dazu war Dialysieren gegen Startpuffer (einen Phosphat enthaltenden Puffer) notwendig. Bei dem nach 'A' (Dextransulfatfällung) entstandenen Produkt reichte das exzessive Dialysieren gegen diesen Puffer nicht aus, da wiederholt ein weißer Niederschlag entstand, vermutlich Kalziumphosphat. Deshalb wurde zuerst ca. 36 Stunden gegen 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung bei häufigem Pufferwechsel dialysiert und danach gegen Startpuffer. Durch dieses Zwischendialysieren verzögerte sich das Auftragen der Proben auf die Säule um fast zwei Tage. Der Durchlauf der beiden Proben wurde nur jeweils einmal wieder auf die Säule aufgetragen. Im Reinheitsgrad unterschieden sich die Endprodukte nicht, jedoch erheblich in ihren Konzentrationen.

Ausbeute in Prozent, bezogen auf die zum Säulenlauf eingesetzte Menge, nach zwei affinitätschromatographischen Säulenläufen ('C') im Anschluß an die Entfettungsmethoden:

|                       |       | IgG % | Antikörper % |
|-----------------------|-------|-------|--------------|
| 'A' (Dextransulfat)   | & 'C' | 39,7  | 18,3         |
| 'D' (Propanol/Aceton) | & 'C' | 13,0  | 13,9         |

Die geringere Reinheit des mit Methode 'D' (Propanol/Aceton) vorgereinigten Produktes verminderte die Ausbeute bei diesem weiteren Reinigungsverfahren 'C'.

Legt man als Beurteilungskriterien die Ausbeute an IgG und Antikörperaktivität sowie die Reinheit des Produktes zu Grunde, so erwiesen sich die Kombinationen 'A' & 'B' (Fettfällung mit Dextransulfat/Reinigung und Konzentrierung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und 'A' mit 'C' (affinitätschromatographischer Säulenlauf) den Kombinationen 'D' (Entfettung mit Propanol/Aceton) mit 'B' bzw. 'C' als überlegen.

#### 4.1.4 Vergleich der Methodenkombination aus Entfettung mit Dextransulfat und anschließender Reinigung und Konzentrierung mit Natriumsulfat ('A' & 'B') mit der Reinigung und Konzentrierung mit Polyäthylenglykol ('E').

Die Methodenkombination 'A' & 'B' war an Reinheit des Endproduktes mit der Methode 'E' vergleichbar. Jedoch war die gefundene IgG- und Antikörperkonzentration bei 'E' geringer.

Ausbeute in Prozent nach den Methoden

|                                                          | IgG % | Antikörper % |
|----------------------------------------------------------|-------|--------------|
| 'A' & 'B' (Dextransulfat<br>& $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) | 64,5  | 52,4         |
| 'E' (Polyäthylenglykol)                                  | 44,4  | 40,9         |

Die benötigte Arbeitszeit war für beide Methoden mit ca. 3 Stunden gleich. Der Preis für die Methodenkombination 'A' & 'B' betrug 3,70 DM/20 ml Dotter, während die Kosten für die Methode 'E' nur 0,17 DM/20 ml Dotter ausmachten. Sollen Eier in großer Stückzahl verarbeitet werden und ist die maximale IgG-Ausbeute nicht von vorrangigem Interesse, so werden, bei sonst annähernd gleichen Ergebnissen der beiden Methoden, die Materialkosten entscheidend. Hinzu kommt, daß bei der PEG-Methode der eingesetzte Dotter maximal 1:5 verdünnt werden muß, bei der Dextransulfat-Methode jedoch 1:10. Dies ist insoweit wichtig, als bei größeren Mengen Eidotter meist die Zentrifugenkapazität ein limitierender Faktor ist.

Weder für die Methodenkombination 'A' & 'B' (Jensenius et al., 1981), noch für die Methode 'D' (Bade und Stegemann, 1984), noch für 'E' (Polson et al., 1985) waren in der Literatur Werte über die quantitative Ausbeute angegeben. Jedoch wurde auf den Reinheitsgrad der Methoden hingewiesen.

Die Auflösung in der SDS-Page-Elektrophorese, das heißt die Anzahl der sichtbaren Banden, ist abhängig von der Konzentration und der Menge der aufgetragenen Substanzen. In der auf Seite 55 abgebildeten SDS-Page-Elektrophorese (Abb.11) wurden je 40 µl Proben aufgetragen, die, gemessen am unverdünnten Dotter, 1:5 verdünnt waren. Hiermit wurde das Gel zwar teilweise überladen, so daß die Einzelbanden nicht immer deutlich zu erkennen waren, aber auch schwache Banden wurden dadurch sichtbar. So ließ sich zeigen, daß zwar eine starke Anreicherung des IgG zu verzeichnen war, daß aber auch bei den Methoden 'A' & 'B' (Jensenius et al., 1981) und 'E' (Polson et al., 1985) noch eine Reihe anderer Proteine

zu sehen war, das IgG durch diese Methoden also nicht als Reinsubstanz herzustellen war.

Die affinitätschromatographische Reinigung von IgG, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wird nur dann als Routinemethode eingesetzt werden, wenn es auf reinste Endprodukte ankommt (z.B. reine monospezifische Antiseren für ELISA), da sie eine der Methoden ist, mit der sich spezifische Antikörper mit hohem Reinheitsgrad isolieren lassen. Sie wird zur Reinigung von Dotterantikörpern stets im Anschluß an eine Vorreinigung verwendet.

Die in dieser Arbeit untersuchten Dotterreinigungsmethoden sind schwierig in eine wertende Reihenfolge zu bringen, da jede Methode ihre Stärken und Schwächen hat und keine Methode allen Ansprüchen gerecht wird. So ergeben sich für die Methoden unterschiedliche Bewertungen, je nachdem ob Reinheitsgrad des Endproduktes, die IgG- und Antikörperkonzentration, die Kosten oder die Arbeitszeit als Beurteilungskriterien dienen. Abhängig von den gesetzten Prioritäten ist die am besten geeignete Methode zu wählen (siehe Tab.7, S.80).

| Rang | Reinheit<br>des Produktes | Konzentration in % |              | Kosten<br>DM/20 ml Dotter | Arbeitszeit      |
|------|---------------------------|--------------------|--------------|---------------------------|------------------|
|      |                           | IgG                | AK           |                           |                  |
| 1.   | A & C bzw.                | D                  | 69,5         | E                         | D                |
|      | D & C                     | A & B              | 64,5<br>52,4 |                           |                  |
| 2.   |                           | D & B              | 53,4         | A & B                     | D & B            |
|      |                           |                    | 41,8         | D                         | 3,70<br>3,70     |
| 3.   | A & B bzw.                | E                  | 44,4         | D & B                     | E<br>A & B       |
|      | E                         |                    | 40,9         |                           |                  |
| 4.   | D & B                     | A & C*             | 39,7         | A & C*<br>D & C*          | D & C*<br>A & C* |
|      |                           |                    | 18,3         |                           |                  |
| 5.   | D                         | D & C*             | 13,0         | A & C*<br>D & C*          | D & C*<br>A & C* |
|      |                           |                    | 13,9         |                           |                  |

Tab. 7

Wertender Vergleich der untersuchten Methoden bezüglich der Faktoren Reinheit, Ausbeute an IgG und Antikörper, Kosten und Arbeitszeit.

A = Fettfällung mit Dextransulfat

B = Reinigung und Konzentrierung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (A & B = Jensenius et al., 1981)

C = Affinitätschromatographischer Säulenlauf

D = Entfettung mit Propanol/Aceton (Bade und Stegmann, 1984)

E = Reinigung und Konzentrierung mit Polyäthylenglykol (PEG, Polson et al., 1985)

\* = Diese Ergebnisse sind nur bedingt vergleichbar, da die Höhe der Ausbeute von der Anzahl der durchgeführten Säulenläufe abhängt.

#### 4.2 Vergleich der Serum- und Dotter-Konzentrationen von IgG und Antikörpern

Die Hühner wurden am 28. Tag nach der Erstimmunisierung geboostert, und die untersuchten Serumproben wurden vom 0. bis zum 70. Tag im Wochenabstand gewonnen. Die untersuchten Dotter waren von Eiern, die am Tag der Blutentnahme gelegt worden waren, war dies nicht möglich, so wurde ein Ei vom Tag zuvor bzw. das vom Tag danach verwendet.

Mittlere Serumwerte bei nicht immunisierten Hühnern wurden von Lösch (1972) mit 11,33 mg/ml, von Rose et al. (1974) mit ca. 6 mg/ml, von Rammensee (1984) mit 5,0 mg/ml, beim Truthuhn von Goudswaard et al. (1978) mit 8,9 mg/ml und von Dohms et al. (1978) mit 8,5 mg/ml, angegeben. Übel (1984) fand bei immunisierten Hühnern am 7. Tag p.i. 7,6 mg/ml und am 56. Tag p.i. 9,6 mg/ml. Der in der hier vorliegenden Arbeit ermittelte durchschnittliche Serum-IgG-Gehalt beim unimmunisierten Tier lag bei 7,3 mg/ml und schwankte vom 7. Tag bis zum 70. Tag im Bereich von 6,1 mg/ml und 10,3 mg/ml. Der Anstieg des Serum- und Dotter-IgG vom 7. Tage nach der Boosterung bis zum gemessenen Maximalpunkt betrug zwischen 2 bis 4 mg/ml und war auf die erneute Stimulierung zurückzuführen.

Der Dotter-IgG-Gehalt wurde, wie unter 1.2.1.2 aufgeführt, von 2,9 mg/ml (Rammensee, 1984) bis 20 mg/ml bis 26 mg/ml (Rose et al., 1974) angegeben. In dieser Arbeit wurden im Dotter von unimmunisierten Tieren durchschnittlich 8,6 mg IgG/ml Dotter gefunden, bei den Dottern der immunisierten Tieren lagen die Durchschnittswerte zwischen 6,3 mg IgG/ml und 9,8 mg IgG/ml. Die Immunisierung hatte keinen deutlichen und anhaltenden Einfluß auf die Menge des IgG in Serum und Dotter.

Der Antikörpergehalt stieg im Dotter mit etwa 7 Tagen Verzögerung gegen über dem Serum an, dies war sowohl nach der Immunisierung als auch nach der Boosterung festzustellen. Patterson et al. (1962) zeigten, daß der um 5 bis 6 Tage verzögerte Anstieg des Immunglobulinspiegels im Dotter durch die Folikelfreifung am Ovar bedingt ist. Obwohl der Antikörpergehalt der Eier eines Huhnes von Tag zu Tag erheblichen Schwankungen unterliegt (Heller, 1975), war deutlich die Antikörper steigende Wirkung der Immunisierung und Boosterung zu sehen.

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des IgG-Gehaltes und der Höhe der Antikörpertiter konnte nicht festgestellt werden.

#### 4.3 Salzsäuretenazität des Dotter-IgG

Zur Bestimmung der Salzsäuretenazität war es notwendig, den Dotter 1:20 zu verdünnen, da sonst eine homogene Lösung von Dotter und Salzsäure nicht herzustellen war. Die pH-Werte dieser Proben lagen zwischen dem Ausgangswert des verdünnten Dotters pH 6,5 und dem pH-Wert 0,6, der damit unter dem Wert lag, der für den Magensaft des Menschen angegeben wird.

Die Ausgangswerte der untersuchten Eier variierten erheblich, so daß eine Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse nur durch relative Werte möglich war. Wie unter 3.2 dargestellt, wies das Gesamt-IgG eine höhere Salzsäureresistenz auf als die Antikörper, deren Aktivität nach einer halben Stunde Einwirkung bei pH 2,0 schon

auf 27% der Ausgangsmenge abgenommen hatte, während beim Gesamt-IgG unter gleichen Bedingungen 77% des Ausgangswertes zu finden waren. Schram et al. (1971) untersuchten aus Serum gewonnene, gereinigte BSA-Antikörper-Komplexe (Bovines Serumalbumin) und fanden im pH 2,0-Puffer nach einer halben Stunde noch 29% an Antikörpern wieder. Dies entspricht den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen für die HSA-Antikörper. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß Schram et al. mit gereinigten Antikörpern gearbeitet haben, während hier die Antikörper im Gesamtdotter untersucht wurden.

#### 4.4 Hitzestabilität des Dotter-IgG

Die Hitzestabilität des Dotter-IgG wurde, wie unter 2.6 beschrieben, auf zwei sich ergänzende Arten getestet. Zum einen wurde das ganze Ei gekocht, zum anderen wurde lediglich der verdünnte Dotter im Wasserbad erhitzt. Da die Ausgangswerte der einzelnen Eier stark variierten, und jedes Ei entweder nur 4, 6, 8 oder 10 Minuten gekocht werden konnte, wurden alle Angaben als relative Werte aufgeführt.

Der unbehandelte Wert entsprach 100%, die Ergebnisse nach den einzelnen Kochzeiten wurden darauf bezogen. Um den Einfluß der unterschiedlichen Größe der Eier auf die Inaktivierung der Immunglobuline möglichst gering zu halten, wurden für eine Versuchsreihe Eier möglichst gleicher Größe verwandt. Die maximale Gewichts-differenz lag bei etwa 5 g.

Die Ergebnisse des verdünnten Dotters im Wasserbad wiesen bis 65°C keine Veränderungen auf. Bei 70°C

Wassertemperatur war ein rapider Abfall der IgG- und Antikörper-Werte festzustellen. Dies entspricht dem Phänomen der Eiweißdenaturierung: Das Protein zeigt bis zu einer bestimmten Temperatur keine Veränderungen und fällt nach dem Überschreiten eines Grenzwertes schlagartig aus. Die Antikörper zeigten ebenfalls dieses Verhalten. Bis 65°C war keine Abnahme der Antikörperaktivität zu sehen, eher im Gegenteil eine leichte Aktivierung. Bei 70°C Wassertemperatur, das entspricht einer Kerntemperatur von 68,5 bis 69°C, sank die Antikörperaktivität auf ca. 55%, und nach einer weiteren Temperaturerhöhung um 5°C auf 75°C fiel sie sogar auf 2% der Ausgangsaktivität ab. Vergleicht man die Werte aus diesem Inaktivierungsvorgang mit den Werten des Vier-Minuten-Eies, das im Dotterzentrum eine Antikörperaktivität von 77% und am Rand eine von ca. 68% aufwies, so müßte man annehmen, der Eidotter sei auf knapp 70°C erhitzt worden. Dies stimmt nicht, die Temperaturen lagen bei Probemessungen darunter (Dottermitte: 35°C bis 42°C). In der verfügbaren Literatur fand sich dafür keine Erklärung. Jedoch wird Wärme durch drei Arten verbreitet: Wärmestrahlung, Wärmeleitung und Konvektion. Unter Umständen findet auch im Dotter eine Fließbewegung, bedingt durch das Temperaturgefälle (Konvektion), statt, wodurch möglicherweise am Rand des Dotters koagulierte Proteine über den gesamten Dotter verteilt würden; dies würde die unerwartet starke Abnahme der Antikörperaktivität erklären.

Nach 4 Minuten wies der Dotter in der Mitte eine Antikörperaktivität von 80% und am Rand eine von ca. 73% auf. Nach sechs Minuten hatte die Antikörperaktivität am Rand auf ca. 27% der Ausgangsmenge abgenommen, während in der Mitte keine weitere Veränderung zu verzeichnen war. Beim Acht-Minuten-Ei entstand ein fester Dotter-

rand, der schon mehr als den halben Durchmesser der Dotterkugel eingenommen hatte und nur noch eine Aktivität von 9% aufwies. Beim Zehn-Minuten-Ei war die Dotterkugel durchgehend fest, und dennoch fand man in der Mitte eine Restaktivität von 3,8%.

Das Gesamt-IgG besaß eine höhere Hitzeresistenz als die spezifischen Antikörper. Es zeigte beim Vier-Minuten-Ei bei beiden Proben und beim Sechs-Minuten-Ei in der Mitte keine Abnahme, während am Rand des letzteren ein IgG-Verlust von 46% festzustellen war. Die weitere Abnahme verlief parallel zu der der Antikörperaktivität.

#### 4.5 Überlegungen zur praktischen Anwendung dieser Ergebnisse

Die beiden oben beschriebenen Versuche sollten klären helfen, ob oral applizierte Dotterantikörper bei Mensch und Tier therapeutische Wirkung zeigen könnten und welche Verluste zu erwarten sind.

Der Mensch nimmt Eier meist in zubereiteter, hitzebehandelter Form zu sich. Deshalb wurden die Eier 4 bis 10 Minuten gekocht, wie es dem Frühstücksei entspricht, bzw. der verdünnte Eidotter erwärmt, wie es z.B. beim Einrühren von Eidottern in Soßen und Suppen geschieht. Wie oben beschrieben, können vom Menschen noch aktive Dotterantikörper über das Essen aufgenommen werden, wenn die Eier nicht zu intensiv hitzebehandelt wurden.

Die orale Verabreichung roher Eidotter an Tiere macht in der Regel keine Schwierigkeiten, da sie freiwillig den anscheinend wohlschmeckenden Dotter aufnehmen.

Im Magen treffen die Antikörper ein saures Milieu an, das durch die Salzsäureproduktion der Drüsenzellen

bestimmt wird. Die Magensaft-pH-Werte variieren zwischen pH 0,8 beim Menschen (Forssell and Olbe, 1986) und Werten von über pH 4,5 bei anderen Monogastriern (beim Hund :pH 1,4 bis 4,5, Beninck-Smith, 1974). Die Säurestärke des Magensaftes würde beim Menschen bis zu 90% der Antikörper zerstören. Jedoch wird der pH-Wert des Magens durch die aufgenommene Nahrung und den mit abgeschluckten Speichel gepuffert. So hat Laplace (1974) beim adulten Schwein morgens pH-Werte um 5,5 gemessen. Während der Zubereitung und Austeilung des Futters sanken die Werte auf ca. pH 2, und lagen während der Futteraufnahme knapp unter pH 4. Nachmittags lagen die Werte um eine pH-Einheit tiefer. Außerdem traten tägliche Schwankungen auf. Beim Saugferkel lagen die pH-Werte zwischen 3 und 5 und pendelten sich beim Absatzferkel bei pH 4 ein (Schnabel et al., 1982). Beim Rind wurden pH-Werte um 2,0 bis 4,5 (Diksen, 1977) angegeben. Diese Werte lassen das Passieren der Säurebarriere des Magens für die Eidotterantikörper möglich erscheinen. Die proteolytischen Enzyme Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin stellen ein weiteres Hindernis für die Antikörper dar. Das physiologischer Weise im Darm vorkommende sekretorische IgA widersteht der proteolytischen Zersetzung. Die Sekretkomponente, ein Glykoprotein, schützt die sezernierten IgA-Moleküle vor den proteolytischen Enzymen.

Diesen Schutz haben die IgG-Moleküle nicht aufzuweisen und können daher von den beim adulten Lebewesen hoch wirksamen, proteolytischen Enzymen in Bruchstücke zerteilt werden. Versuche mit proteolytischen Enzymen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, jedoch haben schon 1966 Tenenhouse und Deutsch die Spaltprodukte der Pepsin- und der Papainverdauung beschrieben. Newby und Bourne (1976) setzten Immunglobuline milden Verdauungs-

bedingungen für 2 Stunden aus, wobei bovines IgG<sub>2</sub> und porcines IgG zu 70 bis 75% unverdaut blieben, während bovines s-IgA gar nicht angedaut wurde.

Bei derzeit laufenden Versuchen (im Hause) deutet sich an, daß nach dem Verfüttern von immunisierten Eiern an Mini-Pigs im Dünndarm hohe Antikörperaktivität zu finden ist. Beim Jungtier, besonders bei Kälbern und Ferkeln mit Durchfall, sind die proteolytischen Enzyme noch nicht vollwirksam (Dirksen, 1976). Wie Bartz et al. (1980) berichteten, setzten Farmer Eier betriebseigener Hühner mit Erfolg bei ihren Durchfallkälbern ein. Da das Huhn auf Grund seiner breiten Antikörperkompetenz gegen pathogene und apathogene Keime seiner Umwelt Antikörper bildet, produziert es diese auch gegen die Durchfallerreger, wie Entrobacteriaseae einschließlich E.coli und Clostridien, gegen Rota- und Coronavirus. Heller (1975) zeigte dies durch Immunisieren mit E.coli; Lösch et al. (in Vorbereitung) immunisierten ebenfalls mit E. coli und einer Reihe anderer Bakterien.

Bartz et al. (1980) zeigten, daß junge Mäuse oral durch Dotterantikörper gegen Rotavirus (SA-11) vor 'epidemic diarrhoe of infant mice' (EDIM) geschützt werden konnten. Die Autoren wiesen nach, daß die Infektionsrate von über 90% auf 15% sank. Murakami et al. (1986) haben Kälber mit Milchaustauscher gefüttert, der mit Immunglobulinen angereichert war. Die Gammafraktionen wurden aus dem Serum oder der Kolostralmilch von Kühen gewonnen, die mit bovinem Rotavirus Typ 1 (BRV) und bovinem Coronavirus (BCV) immunisiert waren. Sie zeigten, daß die neonatalen Durchfälle durch die Antikörper zwar nicht verhindert wurden, jedoch die Schwere und Dauer erheblich vermindert wurde.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wiesen Lösch et al. (1986) darauf hin, daß geprüft werden müßte, ob nicht jeder landwirtschaftliche Betrieb bei gemischter Tierhaltung und freilaufenden Hühnern über ein eigenes, hofspezifisches Antikörperreservoir in Form von Eiern verfüge. Würden Eier aus diesem Reservoir mehrfach an neueingestallte Jungtiere verfüttert, müßte sich das Risiko des infektiösen Durchfalls erheblich verringern lassen. In der intensiven Viehzucht ist es nicht mehr möglich, die Tiere frei laufen zu lassen, von daher böte sich der oben aufgeführte passive Schutz der Jungtiere durch betriebseigene Eier nicht an. Doch könnten Hennen in Legebetrieben gezielt mit den Durchfallerregern immunisiert werden und die Eier entsprechend eingesetzt werden. Als Alternative zum Verfüttern der ganzen Eier wäre der Einsatz des Eidotterlyophilisates möglich. Dadurch ginge zwar die bestechende Einfachheit dieses Mittels verloren, jedoch entstünde ein besser lagerfähiges und handelsüblicheres Produkt, ein Pulver. Die routinemäßige Anwendung des Dotters als Antidiarrhoeikum ist zur Zeit noch Spekulation. Die hier durchgeführten in vitro Versuche und der Vergleich einiger IgG-Reinigungsverfahren sollen einen Beitrag dazu leisten, die Anwendungsvielfalt der Dotterantikörper in Zukunft besser nutzen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Der Dotter ist eine leichtverfügbare Antikörperquelle für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Durch die Dotterantikörper werden Serumtiere eingespart, und das Antikörpersektrum erweitert.

Verschiedene Dotter-IgG Reinigungsmethoden wurden untersucht.

Die Dextransulfat-Methode nach Jensenius et al. (1981) verbindet hohe Reinheit und gute Ausbeute an IgG (64,5%) und an Antikörpern (63,1%).

Mit der Polyäthylenglykol-Methode nach Polson et al. (1985) wird bei mäßiger Ausbeute an IgG (44,4%) und an Antikörpern (40,9%) ein hoher Reinheitsgrad erreicht; die Materialkosten sind relativ günstig.

Die Propanol-Aceton-Methode nach Bade und Stegemann (1985) ist eine Fettextraktion mit guter Ausbeute an IgG (69,5%) und an Antikörpern (68,3%) bei relativ geringem Arbeitsaufwand (ca. 60 min) doch erheblichem Gesamtzeitaufwand (6 bis 7 Stunden).

Die Affinitätschromatographie ist für eine weitere Reinigung im Anschluß an eine der oberen Methoden verwendbar. Sie erweist sich als Methode mit sehr gutem Reinheitsgrad. Sie ist relativ teuer und wenig arbeits- doch sehr zeitaufwendig. Sie ist die Methode der Wahl, wenn es um die Reinigung spezifischer Antikörper geht.

Der durchschnittliche IgG-Gehalt liegt beim unimmunisierten Huhn im Serum bei 7,3 mg/ml  $\pm$  2,6 mg und im Dotter bei 8,6 mg/ml  $\pm$  2,6 mg; beim immunisierten Huhn im Serum zwischen 6,1 mg/ml  $\pm$  2,1 mg und 10,3 mg/ml  $\pm$  3,7 mg und im Dotter zwischen 6,3 mg/ml  $\pm$  1,9 mg und 9,8 mg/ml  $\pm$  2,3 mg.

Der durchschnittliche HSA-Antikörpertiter liegt beim unimmunisierten Huhn im Serum bei Titer 5,46 und im Dotter bei Titer 5,50; beim immunisierten und gebooster-ten Huhn liegt er im Serum zwischen Titer 12,75 und Titer 16,21 und im Dotter zwischen Titer 7,54 und Titer 15,80.

Das Dotter-IgG wird zwischen 68,5°C und 74°C denaturiert. Das vier Minuten gekochte Ei zeigt keinen IgG-Verlust, aber eine Abnahme der Antikörperaktivität um 25%. Beim Zehn-Minuten-Ei ist im Zentrum des Dotters noch ein IgG-Gehalt von 8% und eine Antikörperaktivität von 3,8% vorhanden.

Das Dotter-IgG weist eine höhere Salzsäuretenazität als die HSA-Antikörper auf; nach dem Einstellen auf pH 3,0 und einer Einwirkungszeit von zwei Stunden waren 97% IgG und 40% Antikörperaktivität zu finden, bei pH 1,1 nach einer Stunde Einwirkung 60,4% IgG und unter 10% Antikörperaktivität und bei pH 0,6 nach zwei Stunden 2,8% IgG und 0,4% Antikörperaktivität.

## 6. Summary

Purification of IgG and IgG-antibodies from egg yolk and determination of the temperature resistance and the hydrochloric acid tenacity of these immuno-proteins.

Egg yolk is an easily available source of antibodies for diagnostic and therapeutic applications.

By using yolk antibodies animals for serum production can be saved and the spectrum of antibodies can be enlarged.

Different yolk-IgG-purification methods were examined. The dextran sulfate-method, developed by Jensenius et al. (1981) combines high purity and good quantitative results in IgG (64,4%) and antibodies (63,1%).

The polyethylenglycol-method, developed by Polson et al. (1985) offers extreme purity and a moderate content of IgG (44,4 %) and of antibodies (40,9 %), at very low costs of material.

The propane-2-ol-aceton-method, developed by Bade and Stegemann (1985), is a fat extraction with a good yield of IgG (69,5%) and of antibodies (68,3%). The expenditure of work is relatively low (approximately 60 minutes), whereas the expenditure of time is considerably high (about 7 hours).

The affinity-chromatography can be applied for further purification, subsequent to the methods mentioned above. The degree of purity of this method is excellent. This method, however, is very expensive. The expenditure of work is low, but the expenditure of time is very high. It is the method of choice for the purification of specific antibodies.

For the unimmunised hen the average IgG content amounts to 7.3 mg/ml  $\pm$  2.6 mg in the serum, and to 8.6 mg/ml  $\pm$  2.6 mg in the yolk; for the immunised hen the average IgG content lies between 6.1 mg/ml  $\pm$  2.1 mg and 10.3 mg/ml  $\pm$  3.7 mg in the serum, and between 6.3 mg/ml  $\pm$  1.9 mg and 9.8 mg/ml  $\pm$  2.3 mg in the yolk.

For the unimmunised hen the average HSA-antibody-titre lied at titre 5.46 in the serum and at titre 5.50 in the yolk; for the immunised and boosted hen the HSA-antibody-titre laid between titre 12.75 and titre 16.21 in the serum and between titre 7.54 and titre 15.80 in the yolk.

The IgG contained in the yolk is denatured between 68.5°C and 74°C. The egg boiled four minutes does not show any loss of IgG but a diminution in antibody-activity by 25%. In the centre of the yolk of an egg boiled ten minutes, 8% of IgG and 3.8% of the antibody-activity are left.

The IgG contained in the yolk has a higher hydrochloric-acid tenacity than the HSA-antibodies. After adjusting the pH-value to 3.0, 97% of IgG and 40% of antibody-activity could be found two hours later. At pH 1.1 and after one hours' time, 60.4% of IgG and less than 10% of antibody-activity were found. At pH 0.6 and after two hours' time only 2.8% of IgG and 0.4% of antibody-activity were left.

## 7. Literaturnachweis

Altschuh, D., Hennache, G., and van Regenmortel, M.H.V.  
Determination of IgG and IgM levels in serum by Rocket  
Immunoelectrophoresis using yolk antibodies from  
immunized chickens.

J. Immunol. Meth., 69, 1-7 (1984)

Aulisio, C.G., and Shelokov, A.

Substitution of egg yolk for serum in indirect  
Fluorescence Assay for Rous Sarcoma Virus antibody.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 126, 312-315 (1967)

Bade, H., and Stegemann, H.

Rapid method of extraction of antibodies from hen egg  
yolk.

J. Immun. Meth., 72, 421-426 (1984)

Bar-Joseph, M., and Malkinson, M.

Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the  
Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA):A comparison of  
two plant viruses.

J. Virolog. Meth., 1, 179-183 (1980)

Bartz, C.R., Conclin, R.H., Tunstall, C.B., and Steel, J.H.  
Prevention of murine Rotavirus infection with chicken egg  
yolk immunoglobulins.

J. Inf. Dis., 142, 439-441 (1980)

Bradford, M.M.,

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem., 72, 248-252 (1976)

Brambell, F.W.R.

The transmission of passive immunity from mother to young.

In: Frontiers of Biology Vol.18

North Holland Publishing Company, Amsterdam (1970)

Burley, R.W., and Vadehra, D.V.

Chromatographic separation of the soluble proteins of hen's egg yolk: an analytical and preparative study.

Analyt. Biochem., 94, 53-59 (1979)

Burstein, M. et Samaille J.

Nouvelle méthode de séparation et de dosage des lipoprotéines de faible densité.

Ann. Biol. Clin., 17, 23-34 (1959)

Carroll, S.B., and Stollar, B.D.

Antibodies to calf thymus RNA polymerases II from egg yolks of immunized hens.

J. Biolog. Chem., 258, 24-26 (1983)

Caulfield, M.J. and Shaffer, D.

A computer program for the evaluation of ELISA data  
obtained using an automated microtiter plate absorbance  
reader.

J. Immunol. Meth., 74, 205-215 (1984)

Dirksen, G.

Nicht infektiionsbedingte Magen-Darm-Krankheiten des Kalbes  
und des Jungrindes.

Collegium veterinarium 11 , 86-92 (1976)

Dirksen, G.

Verdauungsapparat

In G. Rosenberger

Die klinische Untersuchung des Rindes.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg (1977)

Dohms, J.E., Saif, Y.M., and Bacon, W.L.

Metabolism and passive transfer of immunoglobulins in  
the turkey hen.

Am. J. vet. Res., 39, 1472-1481 (1978)

Dreesman, G.R.

Chicken antibodies: Classes of immunoglobulins and  
enzymatic and reductive dissociation of IgG.

Dissertation, University of Hawaii, Ph.D., (1966)

Engvall, E., and Perlmann, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.

III. Quantification of spezific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immunol., 109, 129-135 (1972)

Fellenberg, R. von

Kompendium der allgemeinen Immunologie.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg (1978)

Fertel, R., Yetiv, J.Z., Coleman, M.A., Schwarz, R.D.,

Greenwald, J.E., and Bianchine, J.R.

Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 1028-1033 (1981)

Forsell, H., Olbe, L.

Gastric acid and bicarbonat secretion in man.

Dig. Dis., 4, 147-161 (1986)

Gardener, P.S., and Kaye, S.

Egg globulins in rapid virus diagnosis.

J. Virol. Meth., 4, 257-262 (1982)

Gornall, D.A., and Kuksis, A.

Resolution of egg yolk lipoproteins by chromatography on thin layers of hydroxylapatite.

Can. J. Biochem., 49, 44-50 (1971/a)

Gornall, D.A., and Kuksis, A.

Molecular species of glycerophosphatides and triglycerides of egg yolk lipoproteins.

Can. J. Biochem., 49, 51-60 (1971/b)

Gottstein, B., and Hemmeler, E.

Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis.

Z. Parasitenk., 71, 273-276 (1985)

Goudswaard, J., van der Donk, J.A., van der Gaag, I., and Noordzif, A.

Peculiar IgA transfer in the pigeon from mother to squab.

Dev. Comp. Immunol., 3, 307-319 (1979)

Goudswaard, J., Noordzif, A., van Dam, R.H., van der Donk, J.A., and Vaerman, J-P.

The immunoglobulins of the turkey (*Meleagris gallopavo*) isolation and characterization of IgG, IgM and IgA in body fluids, eggs and intraocular tissues.

Poultry Sci., 56, 1847-1851 (1977,a)

Goudswaard, J., Vaerman, J-P. and Heremans, J.F.

Three immunoglobulin classes in the pigeon (*Columbia livia*).

Int. Arch. Allergy. appl. Immunol., 53, 409-419 (1977,b)

Goudswaard, J., Noordzif, A., van Dam, R.H., and van der Donk, J.A.

Quantification of turkey immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions.

Z. Immun.-Forsch., 154, 248-255 (1978)

Greengard, O., Sentenae, A., and Mendelsohn, N.

Phosvitin, the iron carrier of egg yolk.

Biochim. biophys. Acta, 90, 406-407 (1964)

Griffin, M., Perry, M. and Gilbert, A.B.

in Physiology and biochemistry of the domestic fowl.

ed. by Freeman, B.M

5, pp. 349-356 (1984)

Academic Press, London

Grizzuti, K., and Perlmann, G.E.

Binding of magnesium and calcium ions to the phosphoglycoprotein, phosvitin.

Biochem., 12, 4399-4403 (1973)

Grizzuti, K., and Perlmann, G.E.

Further studies on the binding of divalent cations to the phosphoglycoprotein, phosvitin.

Biochem., 14, 2171-2175 (1975)

Guttman, R.M., Tebo, T., Edwards, J., Barboriak, J., and Fink, J.N.

The immune response of the pigeon (*Columba livia*).

J. Immunol., 106, 392-396 (1971)

Heller, E.D.

The immune response of hens to multiple *Escherichia coli* injections and transfer of immunoglobulins to the egg and hatched chick.

Res. Vet. Sci., 18, 117-120 (1975)

Hilschmann, N., Watanabe, S., Barnikol, H.U., Laure, C.J., Bertram, J., Horn, J., Englhard, M., Schneider, M. und Dreker, L.

Die Rolle der Evolution im Immunsystem.

Nova Acta Leopoldina, 218, 189-222 (1975)

Jensenius, J.Chr., Andersen, I., Hau, J., Crone, M., and Koch, C.L.

Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG.

J. Immunol. Meth., 46, 63-68 (1981)

Ingles, A.

Antigenic homology of eukaryotic RNA polymerase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 364-371 (1973)

Kaminsky, M., and Durieux J.

Étude comparative des sérum de poule, de coq, de  
poussin, d'embryon et de blanc d'oeuf.

Exp. Cell. Res., 10, 590-596 (1956)

Klemperer, F.

Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die  
Immunisirungstherapie.

Arch. exptl. Pathol. Pharmacol., 31, 356-382 (1893)

Kobayashi, K., and Hirai, H.

Studies on subunit components of chicken polymeric  
immunoglobulins.

J. Immunol., 124, 1695-1704 (1980)

Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., and Roth, T.F.

Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the  
chicken.

Immunol., 19, 157-167 (1985)

Kramer, T.T., and Cho, H.C.

Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's  
egg.

Immunol., 19, 157-167 (1970)

Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of  
the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-685 (1970)

Laplace, J.-P.

Enregistrement du pH intragastrique chez le porc:  
Variations liées à la nature, à l'importance et à  
l'intervalle des repas chez l'animal en finition.  
Ann. Zootech., 23, 89-104 (1974)

Laurell, C.B.

Antigen-antibody crossed electrophoresis.  
Anal. Biochem., 10, 358-361 (1965)

Laurell, C.B.

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis  
in agarose gel containing antibodies.  
Anal. Biochem., 15, 45-52 (1966)

Leslie, G.A.

Ontogeny of the chicken humoral immune mechanism.  
Am. J. Vet. Res., 36, 482-485 (1975)

Leslie, G.A., and Clem, L.W.

Phylogeny of immunoglobulin structure and function.  
III. Immunoglobulins of the chicken.  
J. Exp. Med., 130, 1337-1352 (1969)

Leslie, G.A., and Martin L.N.

Modulation of immunoglobulin ontogeny in chicken: effect  
of purified antibodies specific for  $\mu$  chain on IgM, IgY  
and IgA production.  
J. Immunol., 110, 959-967 (1973)

Loeken, M.R., and Roth, T.F.

Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte.

Immunol., 49, 21-28 (1983)

Lösch, U.

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie.

Habil. Schrift, Universität München (1972)

Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R., and Jürgens, L.

The chicken egg, an antibody source.

J. Vet. Med. B, 33, 609-619 (1986)

Lowry, O.H., Roseborough, N.J., and Farr, A.L.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)

Martin, L.N., and Leslie G.A.

Ontogeny of IgA in normal and neonatally bursectomized chickens with corroborative data on IgY and IgM.

Proc. Soc. exp. Biol. Med., 143, 241-243 (1973)

Martin, W.G., Vandegaer, J.E., and Cook, W.H.

Fractionation of livetin and the molecular weight of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -components.

Can. J. Biochem. Physiol., 35, 241-250 (1957)

McIndoe, W.M., and Culbert, J.

The plasma albumins and other livetinproteins in egg yolk of the domestic fowl.

Int. J. Biochem., 10, 659-663 (1979)

Mecham, D.K., and Olcott, H.S.

Phosvitin the principal phosphoprotein of egg and yolk.

J. Am. chem. Soc., 71, 3670-3679 (1949)

van Meter, R., Good, R.A., and Cooper, M.D.

Ontogeny of circulating immunoglobulins in normal, bursectomized and irradiated chickens.

J. Immunol., 102, 370-374 (1969)

Mohammed, H.O., Yamamoto, R., Carpenter, T.E. and Ortmayer, H.B.

A statistical model to optimize Enzyme-Linked Immunosorbent Assay parameters for detection of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in egg yolk.  
Avian Dis., 30, 389-397 (1986, a)

Mohammed, H.O., Yamamoto, R., Carpenter, T.E. and Ortmayer, H.B.

Comparison of egg yolk and serum for the detection of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.  
Avian Dis., 30, 398-408 (1986, b)

Morgan, E.H.

Plasma iron transport during egg laying and after  
gestrogen administration in the domestic fowl  
(Gallus domesticus).

Q. J. exp. Physiol., 60, 233-247 (1975)

Murakami, T., Hirano, N., Inoue, A., Tsuchiya, K., Chitose,  
K., Ono, K. and Yanagihara T.

Prevention of Calf Diarrhea with an immunoglobulin diet  
in beef herds.

Jpn. J. Vet. Sci., 48, 879-885 (1986)

Newby, T.J., and Bourne F.J.

Relative resistance of bovine and porcine  
immunoglobulins to proteolysis.

Immunol. Comm., 5, 631-635 (1976)

Ouchterlony, O.

Diffusion in gel methods for immunological analysis.II.  
Progr. In Allergy, 6, 30-154 (1962)

Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O., and Dixon, F.J.

The metabolism of serum proteins in the hen and chick  
and secretion of serum proteins by the ovary of the hen.

J. Gen. Physiol., 45, 501-513 (1962)

- Piela, Th.H., Gulka, C.M., Yates, V.J., and Chang, P.W.  
Use of egg yolk in Serological tests (ELISA and HI ) to  
detect antibody to Newcastle Disease, Infectious  
Bronchitis and Mycoplasma gallisepticum.  
Avian Dis., 28, 877-883 (1984)
- Polson, A., von Wechmar, M. B., and van Regenmortel, M.H.V.  
Isolation of viral IgY antibodies from yolks of  
immunized hens.  
Immunol. Comm., 9, 475-493 (1980, a)
- Polson, A., von Wechmar, M.B., and Fazakerley, G.  
Antibodies to proteins from yolk of immunized hens.  
Immunol. Comm., 9, 495-514 (1980, b)
- Polson, A., Coetzer, Th., Kruger, J., von Maltzahn, E., and  
van der Merwe, K.J.  
Improvements in the isolation of IgY from the yolks of  
eggs laid by immunized hens.  
Immun. Invest., 14, 323-327 (1985)
- Rammensee, M.  
Immunglobulinkonzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und  
Embryo des Haushuhns.  
Diss. Med. Vet., München (1984)
- Roitt, I,  
Immunologie.  
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1977)

Rose, M.E., and Orlans, E.

Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick.

Dev. Comp. Immunol., 5, 15-20 (1981)

Rose, M.E., Orlans, E., and Buttress, N.

Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white.

Eur. J. Immunol., 4, 521-523 (1974)

Rosenstein, R.W., and Taborsky, G.

Non phosphorylated serine residues in phosvitin.

Biochem., 9, 658-659 (1970)

Schäffer, J.

Die Rezeptesammlung im Corpus Hippiatricorum, Band 1.

(Kapitel 129, 130; Appendices 1-9)

Vet. Med. Diss., München (1981)

Schmittle, S.C.

Studies on Newcastle Disease

V. A comparison of Newcastle Disease antibody titers in blood and egg yolk as measured by the Hemagglutination-Inhibition Test.

Am. J. Vet. Res., 11, 226-230 (1950)

Schnabel, E., Schneider, R. und Schubert, Ch.

Untersuchungen zum pH-Wert im vorderen Trakt beim Absatzferkel.

Arch. Tierernährung, 32, 631-635 (1982)

- Schram, A.C., Hwong, Shu-Jen and Christenson, C.P.  
Purification of chicken Anti-bovine serum albumin  
antibody.  
Immunol., 21, 637-648 (1971)
- Schranner, I. and Löscher, U.  
Immunological identification of avian monomeric and  
polymeric Immunoglobulin M and Immunoglobulin A after  
fractionation on sodium dodecylsulfate pore gradient  
polyacrylamide gels.  
Poul. Sci., 65, 360-368 (1986)
- Schwarzer, H.  
Buch V der Mulomedicina Chironis. Übersetzung und  
Besprechung.  
Vet. Med. Diss., München (1976)
- Song, Ch.-S., Yu, J.-H., Bai, D.H., Hester, P.Y., and Kim,  
K.-H.  
Antibodies to the  $\alpha$ -subunit of Insulin receptor from  
eggs of immunized hens.  
J. Immun., 135, 3354-3359 (1985)
- Tenenhouse, H.S., and Deutsch, H.F.  
Some physical-chemical properties of chicken  $\gamma$ -globulin  
and their pepsin and papain digestion products.  
Immunochem., 3, 11-20 (1966)

Uebel, I.

Untersuchungen zur Veränderung von Struktur und Aktivität der Immunglobuline des Huhnes nach Inkubation des Serums mit 2-Mercaptoäthanol.

Vet. Med. Diss., München (1984)

Vieira, J.G.H., Oliveira, M.A.D., Russo, E.M.K., Maciel, R.M.B., and Pereira, A.B.

Egg yolk as a source of antibodies for human Parathyroid Hormone (hPTH) Radioimmunassay.

J. Immunoassay, 5, 121-129 (1984)

Williams, J.

Serum proteins and the livetins of the hen's egg yolk.

Biochem. J., 83, 346-355 (1962)

Yamaguchi, S., Imada, T., Kawamura, H., Taniguchi, T., and Kawakami, M.

Pathogenicity and distribution of Egg-Drop Syndrome-1976 Virus (JPA-1) in inoculated laying hens.

Avian Dis., 25, 642-649 (1981)

Yamamoto, H., Watanabe, H., Sato, G., and Mikami, T.

Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity.

Jap. J. vet. Res., 23, 131-140 (1975)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine jederzeit freundlich gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. I. Schraner danke ich für die hilfreiche Einarbeitung und die gute Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Ebenfalls danke ich allen übrigen Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfsbereitschaft, besonders Herrn Dr. P. Schmidt, Herrn R. Kühlmann und Frau Kuntze.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.



## Lebenslauf

Name: JÜRGENS Ludwig

Herkunft: geb. am 04.05.1956 in Hürth-Hermülheim  
Vater: Franz Heinrich Jürgens  
leitender Regierungsdirektor  
Mutter: Hildegard Jürgens geb. Schneider  
Oberstudienrätin  
römisch katholisch

Schulbesuch: 1963-1967 Grundschule in Hürth-Hermülheim  
1967-1976 Hansa-Gymnasium in Köln  
Juni 1976 Abitur

prakt. Ausbildung: Nov. 1976 - Dez. 1978 Ausbildung im Fleischer-  
handwerk in der Metzgerei Eckhard in Köln mit  
abschließender Gesellenprüfung

Studium: 1979-1980 Sprachlehrgänge in Grenoble  
WS 1980/81 - SS '85 Studium der Tiermedizin  
in München

Nov. 1985 Staatsexamen  
Feb. 1986 Approbation zum Tierarzt  
Jan. 1986 Beginn der Doktorarbeit  
bei Prof. Dr. U. Lösch

April 1986 - Okt. '86 teilzeitbeschäftigte  
Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut  
für Physiologie, Physiologische Chemie  
und Ernährungsphysiologie der Tierärztli-  
chen Fakultät der Universität München.

Ab Feb. 1987 Assistent in der Tierklinik  
Dr. Herrmann in Mönchengladbach.













